München, 1960.

Über eine neuartige Trennung von DNP-Aminosäuren, DNP-Peptiden und aromatische Nitrogruppen enthaltenden Verbindungen an Polycaprolactam

von

HANS VON PORTATIUS

Über eine neuartige Trennung von DNP-Aminosäuren, DNP-Peptiden und aromatische Nitrogruppen enthaltenden Verbindungen an Polycaprolactam

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

LUDWIGS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT

zu

MÜNCHEN

vorgelegt

von

Hans von Portatius

aus

Köthen

im Januar 1960

Berichterstatter: Professor Dr. W. Graßmann

Professor Dr. R. Huisgen

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 1960

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, in der Zeit von Juli 1957 bis November 1959 ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. W. Graßmann, möchte ich für die Ermöglichung dieser Arbeit, für die vielen anregenden Diskussionen und nicht zuletzt für sein in hohem Maße erwiesenes stetes Wohlwollen meinen ergebensten Dank aussprechen.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. H. Hörmann herzlich danken für seine stete Hilfsbereitschaft.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsübersicht

A. Einleitung — Seite

1. Übersicht über die bisherige chromatographische Verwendung von Polyamid 5

2. Zusammenstellung der bisher bekannten Möglichkeiten zur säulenchromatographischen Trennung der untersuchten Stoffklassen 6

B. Problemstellung 9

C. Material und Methoden 10

D. Ergebnisse

1. Chromatographische Trennversuche

a) Versuche an DNP-Aminosäuren, DNP-Peptiden und DNP-Aminoalkoholen 21

b) Versuche an Derivaten des 2.4-Dinitroanilins, an Polynitroverbindungen und 2.4-Dinitrophenylhydrazonen 58

2. Versuche zur Wirkungsweise der Polyamidsäule und der Elutionsmittel

a) Quantitative Bestimmung der Adsorption von DNP-Glycin an Perlonpulver in Abhängigkeit von der DNP-Glycinkonzentration 60

b) Elutionsversuche mit reinen Lösungsmitteln 70

E. Diskussion der Ergebnisse

1. Über die Art der Bindung von aromatischen Nitrogruppen an Polyamid: Wasserstoffbrückenbindung und Dipolbindung 74

2. Über mögliche räumliche Lagen der DNP-Verbindungen an Polyamid und deren Beziehung zur Eluierbarkeit 80

3. Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der benutzten Lösungsmittel 85

F. Zusammenfassung 90

G. Literaturzusammenfassung 91

H. Lebenslauf

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555225_0057

A. Einleitung

1. Übersicht über die bisherige chromatographische Verwendung von Polyamid.

Polyamid als chromatographisches Adsorbens ist noch sehr jung. Carelli, Liquori und Mele[1] berichteten in einer Kurzmitteilung in der Nature über Versuche zur Trennung der drei isomeren Xylenole an Polyamid. Die Versuche sind in der Technik der für analytische Zwecke früher vielfach verwandten Frontalanalyse ausgeführt, die ihrem Wesen nach nur zu einer unvollständigen Zerlegung von Gemischen führt. In einer schon 1953 begonnenen, aber erst im Jahre 1956 veröffentlichten Arbeit zeigten unabhängig davon Graßmann, Hörmann und Hartl[2], daß man allgemein Phenole in der Technik der Elutionschromatographie vielfach vollständig trennen kann, wobei sie feststellten, daß Nitrophenole verhältnismäßig stark zurückgehalten werden. Die Anwendung der neuen Trennmethode bei der Aufklärung des komplizierten Gerbstoffgemisches von picea excelsea durch Graßmann und Mitarb.[3] eröffnete den Weg zu weiteren Naturstofftrennungen: So trennten Schmidt und Schönleben[4] die Farbstoffe der roten Rübe, M. Oppelt[5] die Flavone des Hirschkolbensumachs, denen weitere Versuche zur Trennung von Flavonen durch Hörhammer[6] und Neu[7] folgten. A. Butenandt berichtete kürzlich über die Trennung von Ommochromen[8].

Weitere Anwendungen der Polyamidsäule durch Graßmann und Mitarb. bestehen in der Trennung von Gerbstoffen und Nichtgerbstoffen[9], der Trennung von mehrkernigen Phenolen[10] und der Prüfung des Adsorptionsverhaltens von Substanzen[11] wie Sulfonamiden, Sulfonsäuren, Karbonsäuren und Nitroverbindungen gegenüber Polyamid. Vor kurzem beschrieben Reich und Barthel[12] die Absorption von Farbstoffen und Sulfonierungsgemischen an Polyamidsäulen, und Hathway und Seakins[13] die Isolierung und Reinigung von Polyhydroxystilbenen aus Eucalyptus wandoo.

Während der Ausführung vorliegender Arbeit erschien unabhängig von uns eine Mitteilung von Steuerle und Hille[14] über die

Trennung von 7 DNP-Aminosäuren an einer 45 cm langen Nylonsäule mit wäßrigem Phosphatpuffer bei p_H 6,8 und einer optimalen Temperatur von 60° C. In einer kurzen Mitteilung[15] berichteten wir gleichzeitig auszugsweise über vorliegende Arbeit, in der Trennungen von DNP-Aminosäuren und DNP-Peptiden mit gänzlich anderen Lösungsmitteln bei Zimmertemperatur durchgeführt wurden.

An Lösungsmitteln wurden bisher benutzt: destilliertes Wasser, Methanol, Aceton, einzeln und in Kombination, sowie 0,15 %ige wäßrige Kaliumacetatlösung[4], Dimethylformamid[3], Pyridin-Essigsäure-Puffer[8] sowie Phosphatpuffer[14].

2. Zusammenstellung der bisher bekannten Möglichkeiten zur säulenchromatographischen Trennung der untersuchten Stoffklassen.

Säulenchromatographische Trennungen von DNP-Aminosäuren an anderen Materialien als Polyamid sind schon lange bekannt. Sanger[16] arbeitete für seine Untersuchungen an Insulin und Hämoglobin zur Trennung der erhaltenen DNP-Aminosäuren ein verteilungschromatographisches Verfahren aus; er verwendete Kieselgel als Träger für die wäßrige stationäre Phase und verschiedene wassergesättigte organische Lösungsmittel als bewegliche Phase. Die R_f-Werte der einzelnen Verbindungen unterlagen dabei jedoch je nach Darstellungsweise des Gels starken Schwankungen, so daß jede Säule vor Beginn der Analyse mit Modellsubstanzen geeicht werden mußte. Das Verfahren konnte von Blackburn[17] durch Verwendung von Kieselgel mit gepufferter stationärer Phase verbessert, das Auftreten relativ hoher Verluste durch irreversible Adsorption jedoch nicht vermieden werden. Durch Verwendung von Kieselgur als stationäre Phase verringerten sich diese Verluste[18]. Perrone[19] trennte so an gepuffertem Celite 545 sämtliche DNP-Aminosäuren. Green und Kay[20] arbeiteten schließlich die heutige Standard-Methode zur Trennung von DNP-Aminosäuren aus. Als Träger dient hier eine Mischung von Kieselgel und Celite, als Lösungsmittel wasserfreie Gemische aus Eisessig, Aceton, Essigester, Benzol und Ligroin.

Die Verwendung eines Kunststoffes für diesen Zweck wurde bisher nur einmal beschrieben. Patridge und Swain[21] führten Allopren als Träger der stationären organischen Phase (n-Butanol) ein. Als bewegliche Phase dienten mit n-Butanol gesättigte Puffer.

Papierchromatographische Trennungen von DNP-Aminosäuren sind sehr zahlreich beschrieben worden, da die DNP-Derivate der Aminosäuren zur Bestimmung von Endgruppen in Proteinen vielfach verwendet werden. Man benutzt sowohl ungepufferte Papiere[22], als auch in neuerer Zeit mehr gepufferte[23]. Auch mit Kautschuk imprägnierte Papiere sind vorgeschlagen worden[21]. Im übrigen sei auf die zahlreichen Zusammenfassungen verwiesen[24].

Die säulenchromatographische Arbeitsmethodik zur Trennung von DNP-Peptiden ähnelt sehr der von DNP-Aminosäuren: Sanger[25] löste als erster das Problem einer Trennung durch Verteilungschromatographie an Silicagel. Als stationäre Phase dienten Wasser, wässerige Salzsäure und Phosphatpuffer, die bewegte Phase bildeten Gemische von Chloroform, Butanol, Essigester, Äther und Methyl-äthylketon. Arginylpeptide wurden infolge ihrer geringen Haftfestigkeit an einer Mischung von Talk/Celite (1:1) mit verdünnter HCl getrennt.

Kroner und Mitarb.[26] übertrugen die Sanger'sche Methodik auf gepufferten Celite. Der Schröder'sche Arbeitskreis[27] ging in Anlehnung an Green und Kay zur Adsorptionschromatographie an Kieselsäure-Celite über. Auch hier wie dort dienen vorzugsweise Mischungen von Aceton, Eisessig, Ligroin und Benzol zur Elution.

Papierchromatographische Arbeiten zur Trennung von DNP-Peptiden sind bis auf einen Hinweis von Consden und Mitarb.[28] und Phillips und Stephen[29], wonach bei der Elution starke Schwanz- und Bandenbildung zu beobachten sind, nicht veröffentlicht.

Die Chromatographie von DNP-Aminoalkoholen, wie sie bei der Bestimmung von carboxylendständigen Aminosäuren in Peptiden und Proteinen nach der Reduktionsmethode[30,31] anfallen, wurde in

Anlehnung an Green und Kay von Graßmann und Mitarb.[32] ausgearbeitet. Als Lösungsmittel dienten auch hier wieder Gemische von Ligroin, Eisessig, Essigester bzw. Aceton. Zur papierchromatographischen Trennung von DNP-Aminoalkoholen wurden von den gleichen Autoren vor allem Mischungen aus Butanol/Essigsäure/Wasser, Dekalin/Essigsäure/iso-Amylalkohol[33], Iso-oktan/iso-Propanol/Wasser[34] und kürzlich Thymol/NaOH[35] angewandt.

Säulenchromatographische wie auch papierchromatographische Trennungen anderer aromatischer Polynitroverbindungen sind bisher nur vereinzelt an einigen Verbindungen beschrieben worden. So trennten Cruse und Mittag[36] m-Dinitrobenzol und sym.Trinitrobenzol an Magnesiumoxyd, Halfter[37] Di- und Trinitrotoluole an Magnesium- und Calciumoxyd, Teague und Mitarb.[38] Polynitrostilbene an Kieselsäure-Celite, Larson und Harvey[39] o- und p-Nitroaniline und Schröder[40] Mono-, Di-, Tri- und Tetranitrodiphenylamine. Isomere Dinitrobenzole, Dinitronaphthaline und Dinitroanthrachinone wurden an mit Petroleum imprägniertem Papier von Franc[41] getrennt. Mit der Chromatographie der Nitrophenole befaßten sich Long und Quayle[42]. Nitrierte Mono- und Dicarbonsäuren trennte Franc[43].

Trennungen von 2.4-Dinitrophenylhydrazonen sind sowohl säulenchromatographisch als auch papierchromatographisch sehr gut ausgearbeitet. Es sollen daher nur einige wenige Beispiele herausgegriffen werden; im übrigen sei auf die Handbücher[24] verwiesen. Als Adsorptionsmaterialien kommen in Frage: Aluminiumoxyd[44], Kieselsäure[45], aktiviertes Calciumsulfat[46], Zinkcarbonat[47], Magnesiumsulfat[48] und Bentonite-Celite[49].

An papierchromatographischen Trennungen seien nur zwei neuere Verfahren erwähnt: Horner und Kirmse[50] imprägnierten das Papier mit einer 50 %igen Lösung von Dimethylformamid in Aceton und entwickeln mit Cyclohexan. Nach Lynn und Mitarb.[51] wird das Papier mit einer 10 %igen Acetonlösung von Phenylcellosolve imprägniert und mit Phenylcellosolve-gesättigtem Heptan entwickelt. Beide Methoden ergeben sehr ähnliche Ergebnisse.

B. Problemstellung

Wie auf Seite 5 gezeigt wurde, bietet Polyamidpulver als chromatographisches Adsorbens vielseitige Verwendungsmöglichkeiten. Den ersten Hinweis für eine gewisse Affinität von Nitrogruppen zur Polyamidbindung gab Otto[52], indem er darauf hinwies, daß sich bei der Einwirkung von aromatischen Nitroverbindungen auf Kollagen auch die Nitrogruppen als Haftgruppen betätigen können. Cannon[53] kam auf Grund von IR-spektroskopischen Untersuchungen zu dem Schluß, daß der Zusammenhalt von Peptidketten weniger durch Wasserstoffbrückenbindungen als durch Dipolkräfte erfolgt. Nitrogruppen mit ihrem hohen Dipolmoment dürften demnach erheblich in Wechselwirkung mit den Polyamidketten treten. Graßmann und Mitarb.[2] beobachteten die im Vergleich zu nicht nitrierten Phenolen extrem langsame Wanderung von p-Nitrophenol an Polyamid. Einen weiteren Hinweis für die Wechselwirkung von aromatischen Nitrogruppen mit Polyamid erbrachte Oppelt[54] bei der Untersuchung des Verhaltens einiger DNP-Aminosäuren gegenüber Polyamid. Die DNP-Aminosäuren werden dabei so fest gebunden, daß ihre Elution sogar mit Dimethylformamid nur sehr zögernd und unvollkommen gelingt.

Mir oblag es nun, auf breiter Basis systematisch das Verhalten von aromatischen Nitroverbindungen gegenüber Polyamid zu untersuchen, und dabei insbesondere praktisch brauchbare Methoden zur Trennung von DNP-Aminosäuren und DNP-Peptiden an Polyamiden auszuarbeiten.

C. Material und Methoden

1. Herkunft der Substanzen

DNP-Aminosäuren	Sie wurden teils von den Mann Research Laboratories, New York 6, N.Y., bezogen, teils nach der Vorschrift von Sanger, Biochem.J. 39 507 (1945) durch Umsetzen von FDNB und der entsprechenden Aminosäure hergestellt.
DNP-α-amino-butyrolacton DNP-α-amino-valerolacton DNP-α-amino-valeriansäure	hergestellt von A. Müller; s. dazu Diplomarbeit A. Müller, München 1957[55]
DNP-Peptide	Sie wurden erhalten durch Umsetzen von FDNB mit den entsprechenden Peptiden.
DNP-Aminoalkohole	hergestellt nach der Reduktionsmethode aus den entsprechenden DNP-Aminosäuren, s. Chem.B. 88 102 (1955)
2.4-Dinitrophenylhydrazone	erhalten durch Umsetzen von 2.4-Dinitrophenylhydrazin und dem entsprechenden Aldehyd.
Nitrierte Aromaten	käufliche Produkte der Firmen Merk, Darmstadt, und Schuchardt, München
1.4-Butandioldiglycidäther	wurde vom Versuchslabor der Chemischen Werke Hüls zur Verfügung gestellt.

2. Die verwendeten Säulenmaterialien

Alle chromatographischen Untersuchungen wurden mit Ultramid BM 228, monomerenarm, (Polycaprolactam) der BASF durchgeführt (Siebgröße 0,02 mm).

Die an Ultramid BM erzielten Ergebnisse ermutigten dazu, auch andere Polyamide, besonders solche mit größerem Abstand der Wasserstoffbrückenbindungen voneinander zu untersuchen. So wurden folgende Produkte der BASF bei der Firma Knapsack-Griesheim AG nach einem geschützten Kaltmahlverfahren bei tiefen Temperaturen gemahlen und nachträglich auf eine Korngröße von unter o,2 mm ausgesiebt:

Ultramid K 237 (Polycapryl-lactam)

Ultramid S (Kondensationsprodukt aus Sebacinsäure und Hexamethylendiamin)

Ultramid 6 A (Mischpolyamid aus ca. 60 % Adipinsäure-Hexamethylendiamin und 40 % Caprolactam)

Es war geplant, Vergleichsmessungen mit den gleichen Lösungsmitteln durchzuführen, wie sie an Ultramid BM verwendet wurden. Leider tritt bei den drei oben zitierten Polyamiden mit DMFA/Eisessig/Wasser/Alkohol 5 : 10 : 30 : 20 eine derartige starke Quellung ein, die zur Verklumpung und teilweisen Auflösung des Materials führt, daß von einem säulenchromatographischen Vergleich Abstand genommen werden mußte.

3. Methoden

a) Herstellung der Perlonsäulen:

Ultramid BM der BASF (Siebgröße 0,2 mm) wurde in dem gleichen Lösungsmittel, mit welchem man später zu eluieren gedenkt, aufgeschwemmt und drei Stunden zur Austreibung kapillar eingeschlossener Luftbläschen heftig mit Hilfe eines Rührmotors gerührt. Alsdann wurde die Aufschwemmung möglichst in einem Guß in eine mit Ablaßhahn und Glaswollpfropfen versehene Säule von 9, bzw. 14 mm innerem Durchmesser gegeben. Mit Druckluft (250 - 300 mm Wassersäule) wurde für ein schnelles Absetzen der Polyamidkörner und eine ziemlich gleichmäßige Packung der Perlonsäule gesorgt (auf keinen Fall helfe man mit einem dicken Glasstab nach). Gegebenenfalls fülle man erneut Perlonaufschlämmung nach bis zur gewünschten Füllhöhe.

Zur Ermittlung des Eigenvolumens der Säule wurde diese nach beendetem Versuch mit wässrigem Ammoniak ins Gleichgewicht gesetzt und alsdann eine Kupfertetraminsulfatlösung durch die Säule wandern gelassen. Da es sich aber im Laufe der Versuche herausstellte, daß Kupfertetraminsulfat doch, allerdings in sehr geringem Maße, adsorbiert wird, wurde der R_f-Wert stets auf die Wanderungsgeschwindigkeit von Di-DNP-Tyrosin, welcher schneller als Kupfertetraminsulfat wandert, in dem jeweiligen Lösungsmittel bezogen.

b) Ausführung der chromatographischen Trennungen:

Zur Chromatographie wurden jeweils 0,5 ccm der zu untersuchenden Lösung in Alkohol aufgebracht (bei Verwendung eines Säulendurchmessers von 14 mm, 1 ccm). Diese enthielt in den meisten Fällen 0,1 - 2 mg je aufgebrachter Komponente. War die Löslichkeit in Alkohol sehr gering, z. B. bei Di-DNP-Verbindungen und DNP-Peptiden, so wurde sie durch Zugabe von wenig N-Dimethylformamid, bzw. Eisessig erhöht. Verwendung von Dioxan und Aceton bewährte sich wenig, da manchmal schon beim Auftragen eine teilweise Auftrennung auftrat. Anschließend wurde mit dem entsprechenden Lösungsmittel nachgewaschen. Zur Überwindung des Widerstandes der Säulenfüllung wurden in der Regel zwei lange schmale Trichter mit etwa je 300 ccm Inhalt auf die Säule aufgesetzt. Das ausfließende Eluat wurde, wenn nicht anders vermerkt, mit einem Fraktionsteiler in Fraktionen zu 1 ccm aufgefangen.

Die Menge der eluierten DNP-Verbindung wurde durch Messung der Extinktion bei 366 mμ im Kolorimeter Medeor der Firma Eppendorf bestimmt.

Die Adsorptionsbanden konnten im UV-Licht als graue bis purpurfarbene Schatten auf der weiß fluoreszierenden Säule erkannt werden.

c) Aufnahme der UV-Spektren:

Die im Zusammenhang mit der theoretischen Interpretation des Elutionsvermögens der einzelnen Lösungsmittelgemische wesent-

lichen UV-Spektren,(s. S.15)wurden in folgender Weise aufgenommen:

4,21 mg DNP-Alanin (0,066 µMol/L) wurden in 250 ml Alkohol gelöst. Dieser Lösung wurden je 10 ccm entnommen, der Alkohol im Vakuum entfernt und der Eindampfrückstand mit je 10 ccm des entsprechenden Lösungsmittels aufgefüllt. Sämtliche Spektren wurden mit dem Quarzspektrographen der Firma Carl Zeiss aufgenommen.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Lage der Maxima und der Höhe der dazugehörigen Extinktionen.

Tabelle 1

UV-Spektren von DNP-Alanin in verschiedenen Lösungsmitteln.

Abb.	Lösungsmittel	Maxima in mµ			dazugehörige Extinktion		
		λ_1	λ_2	λ_3	ϵ_1	ϵ_2	ϵ_3
1	Ameisensäure	250	290	-	7450	11623	-
	Benzol	250	280	-	4340	6665	-
2	Formamid	250	290	350	7450	8990	10524
	Eisessig +)	260	-	340	9610	-	17360
	tert. Butanol	245	-	310	12190	-	10230
3	Glykolmonochlorhydrin	240	-	330	17826	-	8525
	Methanol	240	-	310	19950	-	11780
	Äthanol p. a.	245	-	350	17980	-	19220
4	n-Propanol	230	-	350	30200	-	20600
	n-Butanol	245	-	360	16430	-	20150
	n-Amylalkohol	265	-	345	12980	-	18900
5	n-Hexanol	265	-	340	13740	-	15850

Fortsetzung von Tabelle 1

Abb.	Lösungsmittel	Maxima in m/u			dazugehörige Extinktion		
		λ_1	λ_2	λ_3	ε_1	ε_2	ε_3
5	n-Heptanol	265	-	345	9998	-	17400
	n-Oktanol	230	-	345	24300	-	19940
6	Aceton	-	-	330	-	-	10850
	Essigester +)	258	-	340	9610	-	18600
	Methylcellosolve	260	-	360	18290	-	23250
7	Methylcarbitol	260	-	360	12710	-	21700
	DMFA,E,W,Alk (vergällt) 5:10:30:20	260	-	350	9610	-	14104
	Methylcellosolve-acetat	260	-	350	11080	-	19220
8	Carbitolacetat	260	-	350	1178	-	20150
	Kollidin	255 bis 270	-	350	8060	-	11820
	Pyridin	265	-	355	10074	-	20150
9	N-Dimethylformamid	260 bis 270++)	-	370	7440	-	15500
	Natriumbicarbonat +)	265	-	360	9300	-	18600
	Polyäthylenglykol-monoäthyläther	260	-	350 bis 360	7285	-	13175
37	N-Methylacetamid	240	-	340	4495	-	11570

+) entnommen aus H. Hörmann, J.Lamberts und G. Fries, Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem. 306 42 (1947)

++) infolge zu großer Eigenabsorption des DMFA's nur ungenau meßbar.

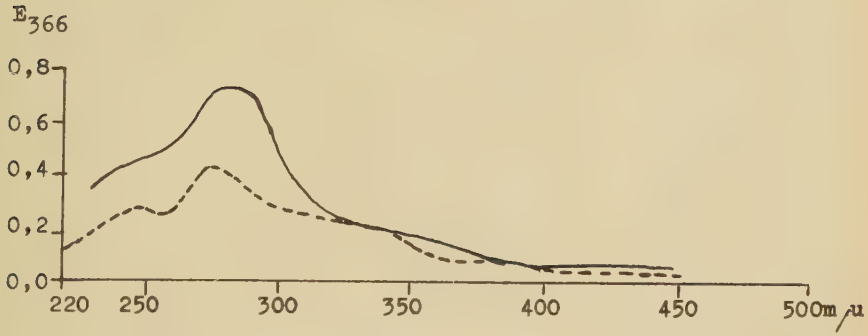


Abb. 1 UV-Absorptionsspektren von DNP-Alanin in Ameisensäure (——) und Benzol (·····).

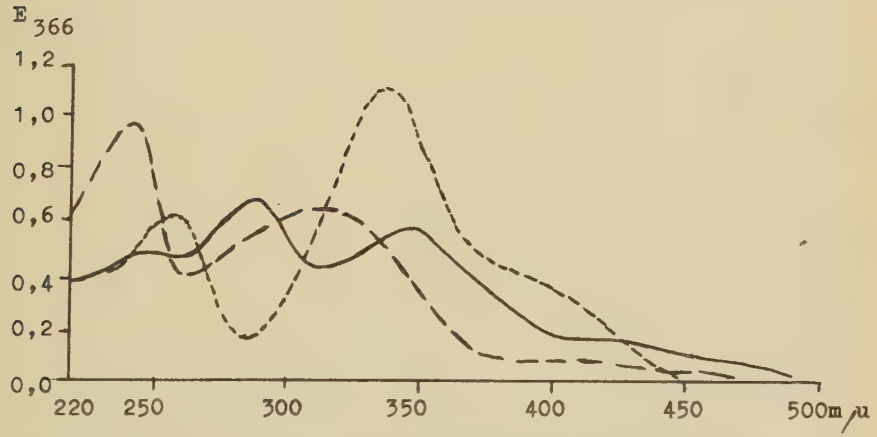


Abb. 2 UV-Absorptionsspektren von DNP-Alanin in Formamid (——), Eisessig (- - - -) und tert. Butanol (— — —).

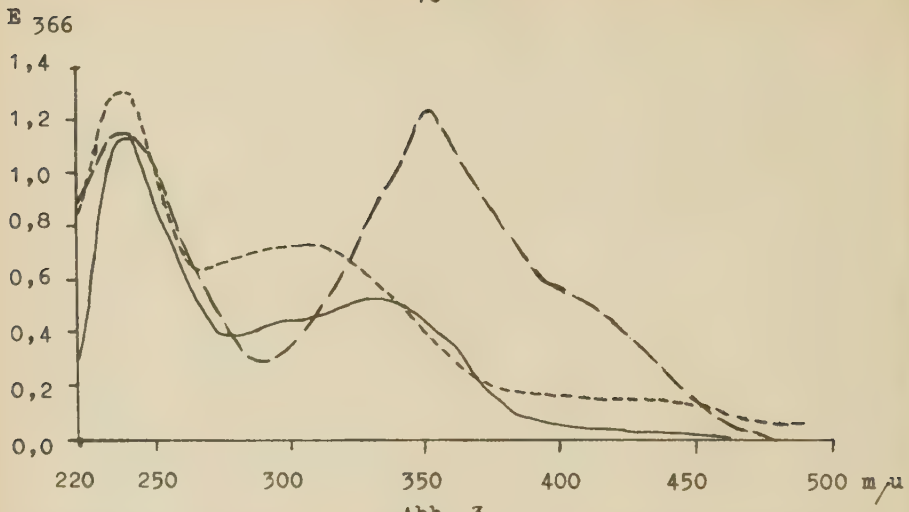


Abb. 3

UV-Absorptionsspektren von DNP-Alanin in Glykolmonochlorhydrin (———), Methanol (- - - -) und Äthanol (— — —).

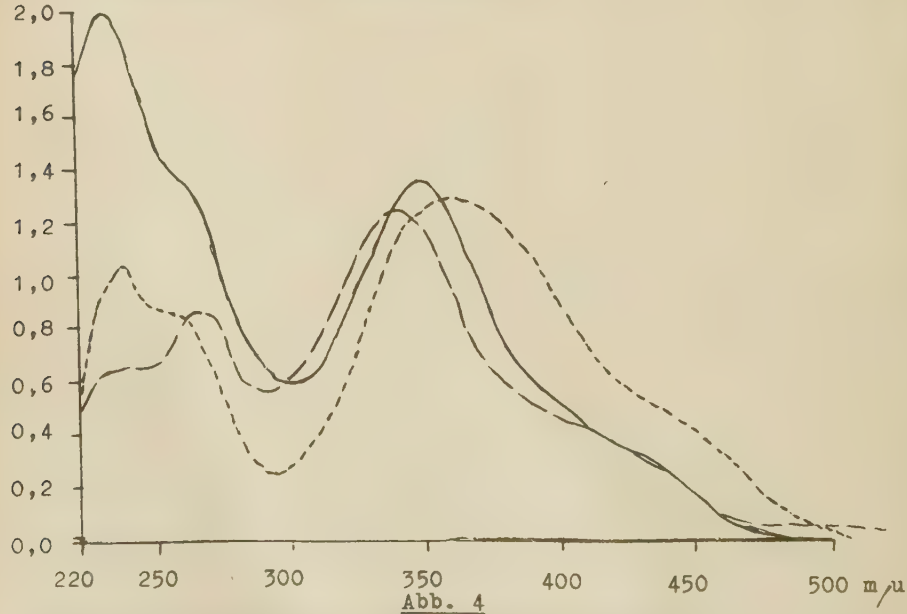


Abb. 4

UV-Absorptionsspektren von DNP-Alanin in Propanol (———), n-Butanol (- - - -) und n-Amylalkohol (— — —).

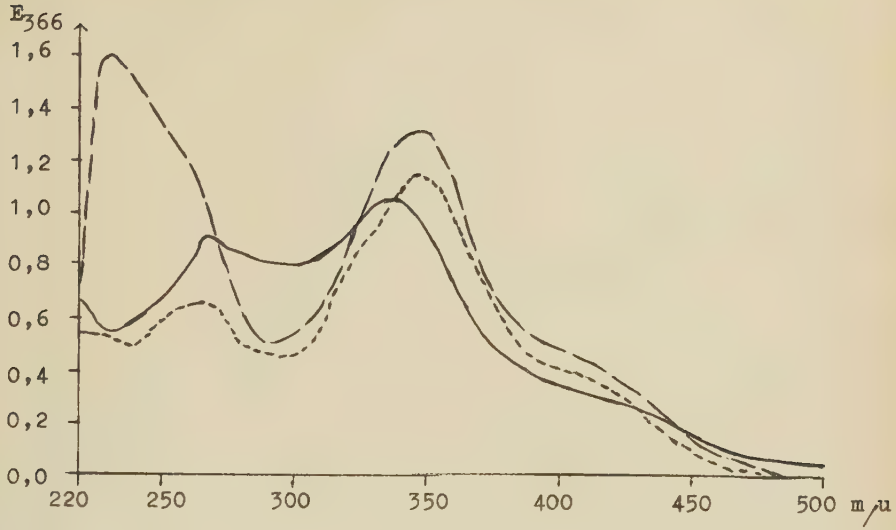


Abb. 5 UV-Absorptionsspektren von DNP-Alanin in Hexanol (——), Heptanol (- - - -) und Oktanol (—— ——).

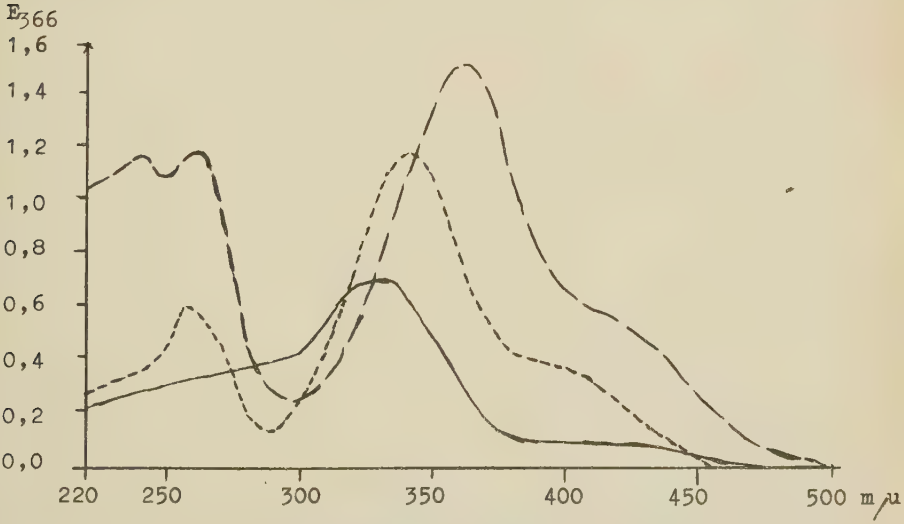


Abb. 6 UV-Absorptionsspektren von DNP-Alanin in Aceton (——), Essigester (- - - -) und Methylcellosolve (—· ——).

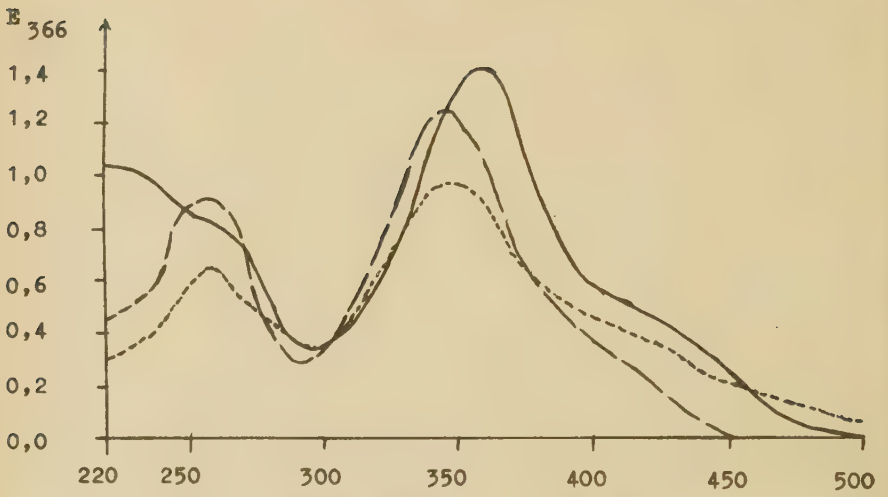


Abb. 7 UV-Absorptionsspektren von DNP-Alanin in Methylcarbitol (——), einem Gemisch von DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5 : 10 : 30 : 20 (- - - -) und Methylcellosolveacetat (—— ——).

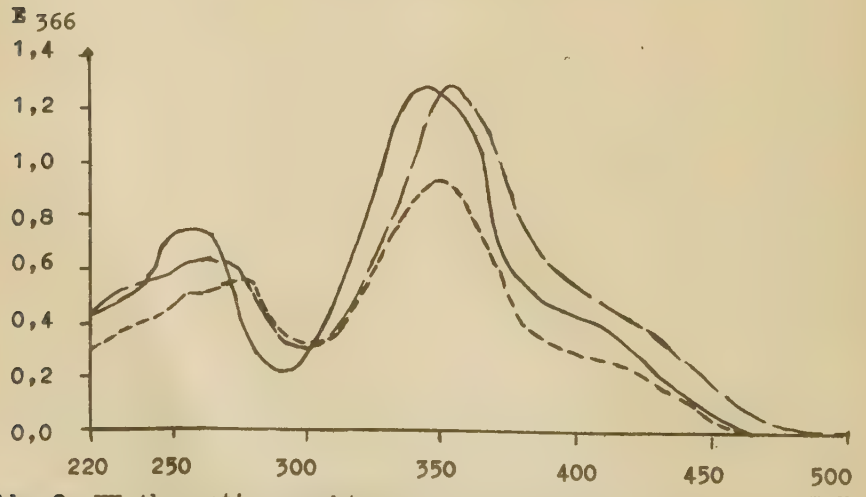


Abb. 8 UV-Absorptionsspektren von DNP-Alanin in Carbitol-acetat (——), Kollidin (- - - -) und Pyridin (—— ——).

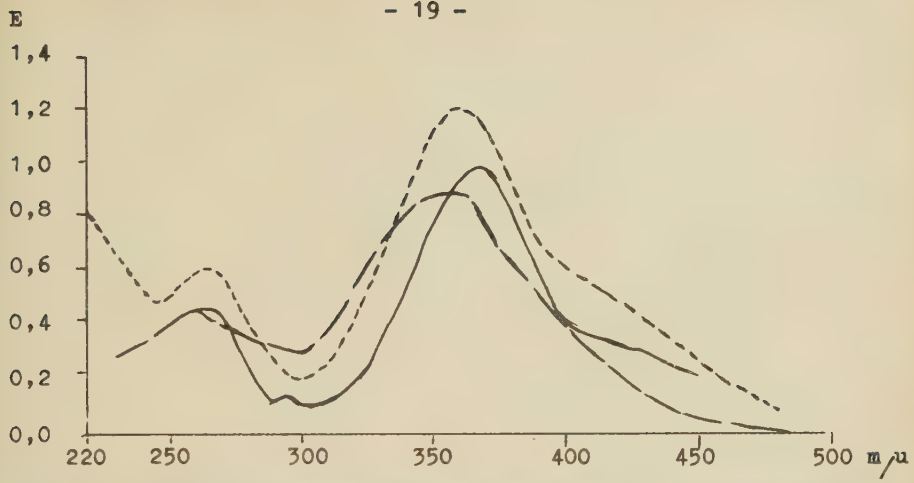


Abb. 9 UV-Absorptionsspektren von DNP-Alanin in N-Dimethylformamid (——), Natriumbicarbonat (- - - -) und Polyäthylenglykolmonoäthyläther (—— ——).

d) Herstellung der Eichkurven

Die bei 366 mμ gefundenen molaren Extinktionen sind in Tabelle 2 wiedergegeben (s. S. 20).

Wie man sieht, ist die Extinktion bei Mono-DNP-Verbindungen innerhalb der Grenzen von 0,98 bis 1,25 konstant, wobei DNP-Prolin eine Ausnahme bildet, und erreicht bei der geprüften Di-DNP-Verbindung den doppelten Wert. Die von Rao und Sober[56] angegebenen Extinktionswerte liegen durchwegs höher und sind mit den erhaltenen nicht vergleichbar, da sie sowohl in anderen Lösungsmittelsystemen als auch bei der Wellenlänge des Extinktionsmaximums aufgenommen wurden, was in unserem Falle bei Verwendung des Gerätes "Medeor" der Firma Eppendorf nicht möglich war.

Tabelle 2

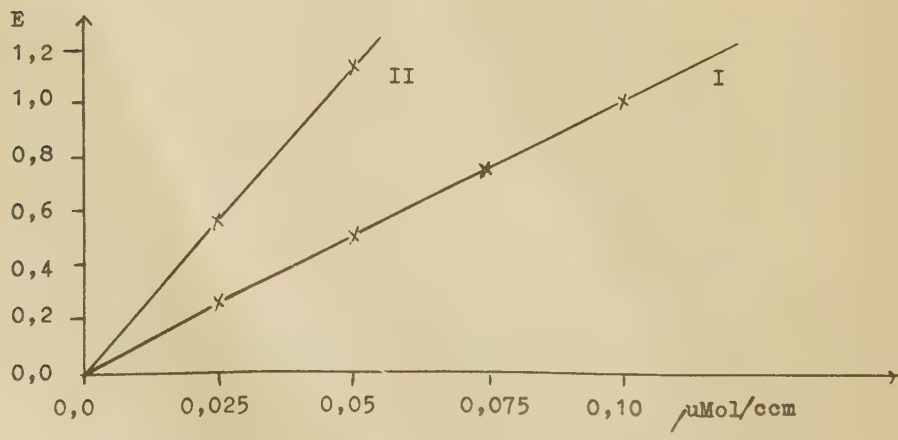
Extinktionen von DNP-Verbindungen in einem Gemisch von 33,3 % DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5 : 10 : 30 : 20 und 66,6 % Alkohol (Konzentration 0,1 µMol pro ccm).

Verbindung	Extinktion
DNP-Glycin	1,08
DNP-Valin	0,98
DNP-Phenylalanin	1,09
DNP-α-Arginin	1,12
DNP-Threonin	1,25
DNP-Prolin	1,68
DNP-α-amino-butyrolacton	1,11
DNP-gly-phe-glu-OH	1,07
DNP-leu-digly-OH	1,10
Di-DNP-leugly-lys-OH	2,29 +)

+) extrapoliert auf unendliche Verdünnung

Abb. 10

Beispiel der Eichkurve einer Mono-DNP- und einer Di-DNP-Verbindung in einem Gemisch von 33,3 % DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5:10:30:20 und 66,6 % Alkohol; I = DNP-Glycin, II = Di-DNP-leu-gly-lys-OH. Die Schichtdicke betrug 1 cm.



D. Ergebnisse

1. Chromatographische Trennversuche

a) Versuche an DNP-Aminosäuren, DNP-Peptiden und DNP-Aminoalkoholen.

Als Modellsubstanzen für Vorversuche dienten DNP-Prolin und DNP-α-amino-butyrolacton, die in ausreichender Menge zur Verfügung standen, und deren Trennung im Rahmen der laufenden Arbeiten an unserem Institut über die Quervernetzung im Kollagen[55] interessierte.

Zunächst wurde das chromatographische Verhalten beider Substanzen gegenüber einer Reihe organischer Lösungsmittel geprüft (s. Tabelle 3).

Tabelle 3

Elutionswirkung verschiedener organischer Lösungsmittel gegenüber eines an Ultramid BM adsorbierten Gemisches von DNP-Prolin und DNP-α-aminobutyrolacton. +)

Elutionsmittel	Erzielte Elutionswirkung
Wasser	keine Wanderung feststellbar
Methanol	Wanderungslänge 2 mm, Zonenverbreiterung
Äthanol (mit 1% Petroläther vergällt)	Wanderungslänge 6 mm, sehr geringe Zonenverbreiterung
Propanol	Wanderungslänge 3 mm, Zonenverbreiterung
Aceton	Wanderungslänge 6 mm, starke Zonenverbreiterung
Ligroin (Kp 90-100°)	keine Wanderung feststellbar
Chloroform	keine Wanderung feststellbar
Pyridin	Wanderung, sehr starke Zonenverbreiterung
Formamid	Wanderung, Verschmierung der ganzen Säule
N-Dimethylformamid	Wanderung, Verschmierung der ganzen Säule
0,1 n NaOH	Wanderung mit der Lösungsmittelfront

+) Säulenlänge 15 cm, Ø 14 mm, Menge des Elutionsmittels 50 ccm.

Auf die Prüfung starker Protonendonatoren, wie z.B. Ameisensäure und Eisessig, wurde verzichtet, da sie Ultramid BM angreifen.

Auf Grund der genannten Versuche ergaben sich folgende Richtlinien: Lösungsmittel wie Pyridin, Formamid und N-Dimethylformamid, besitzen eine erhebliche Elutionswirkung, sind aber wegen der starken Zonenverbreiterung für sich allein wenig geeignet. Ihre Basenwirkung überführt DNP-Prolin teilweise in eine ionische Form, die dann praktisch mit der Lösungsmittelfront wandert (wie Oppelt M. feststellte, wandern alle DNP-Aminosäuren in 0,1 n Natronlauge mit der Lösungsmittelfront). Geeignete Lösungsmittel, wie Methanol und Äthanol verursachen wohl nur eine geringe Zonenverbreiterung, besitzen jedoch eine zu geringe Elutionskraft. Es mußten also beide Prinzipien miteinander vereint werden unter Vermeidung eines alkalischen Milieus. Dieses Ziel wurde durch Zusatz von Eisessig erreicht (s. Tabelle 4, S. 23).

Mischt man N-Dimethylformamid mit Eisessig im Verhältnis 1 : 1 (Nr. 1), so wandern beide Komponenten mit der Lösungsmittelfront. Zusatz von Wasser (Nr. 2) bewirkt eine langsamere Wanderung, führt jedoch zu keiner Trennung. 2 Teile 32 %iger HCl an Stelle von Essigsäure (Nr. 3) lassen ebenfalls beide Verbindungen mit der gleichen Wanderungsgeschwindigkeit laufen. Zusatz von Alkohol (Nr. 4) führt zu einer geringen, jedoch noch ungenügenden Auftrennung beider Komponenten; während eine Erhöhung des Eisessig- und Wassergehaltes (Nr. 6) zu einer starken Verbreiterung der Zone führt, ergibt die Verminderung von beiden (Nr. 7) eine schon gut nachweisbare Trennung (s. Abb. 11 Seite 24).

In einem weiteren Versuch (Nr. 8) wurde die anteilige Wassermenge durch bei Zimmertemperatur mit Borsäure gesättigtes Wasser ersetzt. Auch hier blieb der Trenneffekt noch unbefriedigend. (s. Abb. 12, S.24).

Tabelle 4

Zusammensetzung[+)] von Lösungsmittelgemischen zur Trennung von DNP-Prolin und DNP-α-Amino-butyrolacton an Ultramid BM.

Nr.	DMFA	Eis-essig	• H_2O	Äthanol++)	HCl (32%)	Ergebnis
1	50	50	-	-	-	Wanderg. beid. Subst. mit d. Lösgs.mittelft.
2	50	60	40	-	-	Wanderg. beid. Subst. mit d. Lösgs.mittelft.
3	50	-	58	-	2	Wanderg. beid. Subst. mit d. Lösgs.mittelft.
4	20	30	50	-	-	Wanderg. beid. Subst. fast mit d. Lösgs.mittelfront
5	5	10	30	20	-	langsame Wanderg. beider Substanzen
6	5	15	50	20	-	langsame Wanderg. beid. Subst., starke Verbreiterung der Zonen
7	5	10	30	20	-	mäßige Wanderg. beid. Subst., geringe Trennung, Abb. 11, S. 24
8	5	10	30±)	20	-	mäßige Wanderg. beid. Subst., unvollkommene Trennung, Abb. 12, S. 24
9	4	6	40	20	-	langsame Wanderung beid. Subst., Trennung, Abb. 13, S. 25

+) Angabe in Volumenteile

±) gesättigt mit H_3BO_3

++) mit 1 % Ligroin (K_p 90 - 100° C) vergällt

Abb. 11

Trennung von DNP-Prolin (I) und DNP-α-aminobutyrolacton (II); Säulenlänge 40 cm, Ø 9 mm. Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5:10:30:20.

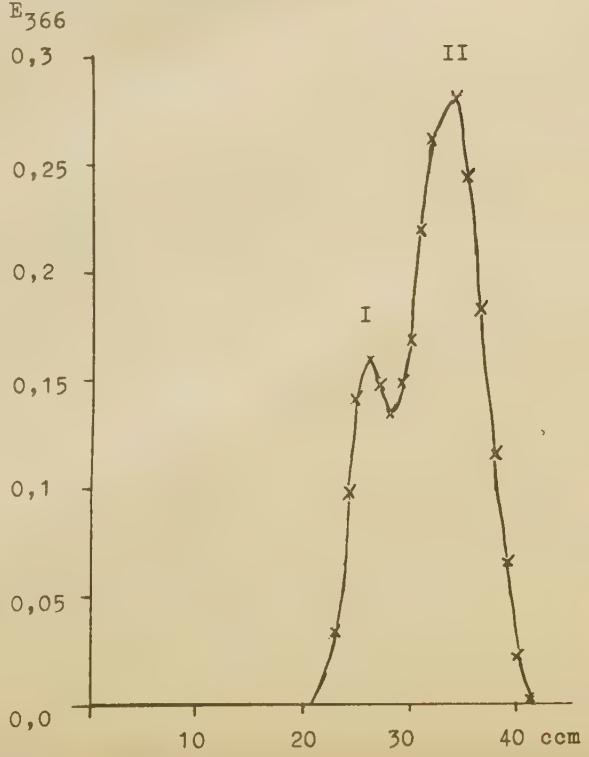
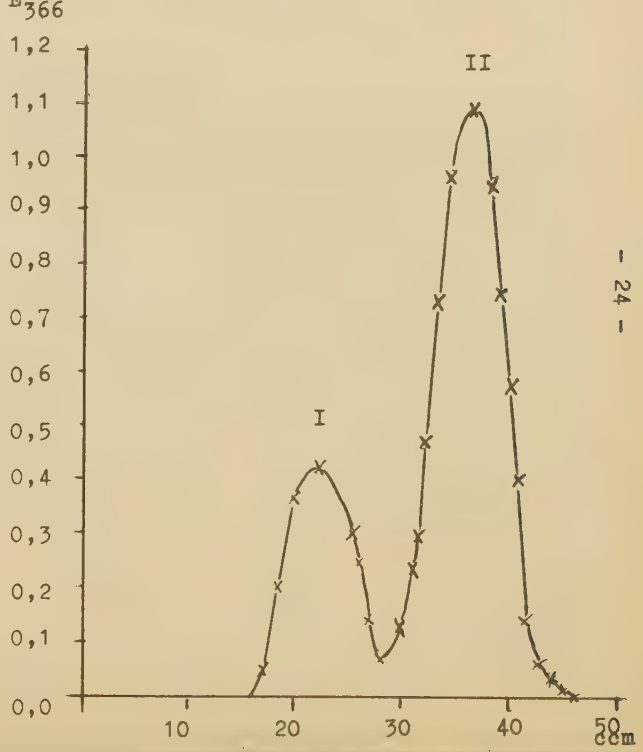


Abb. 12

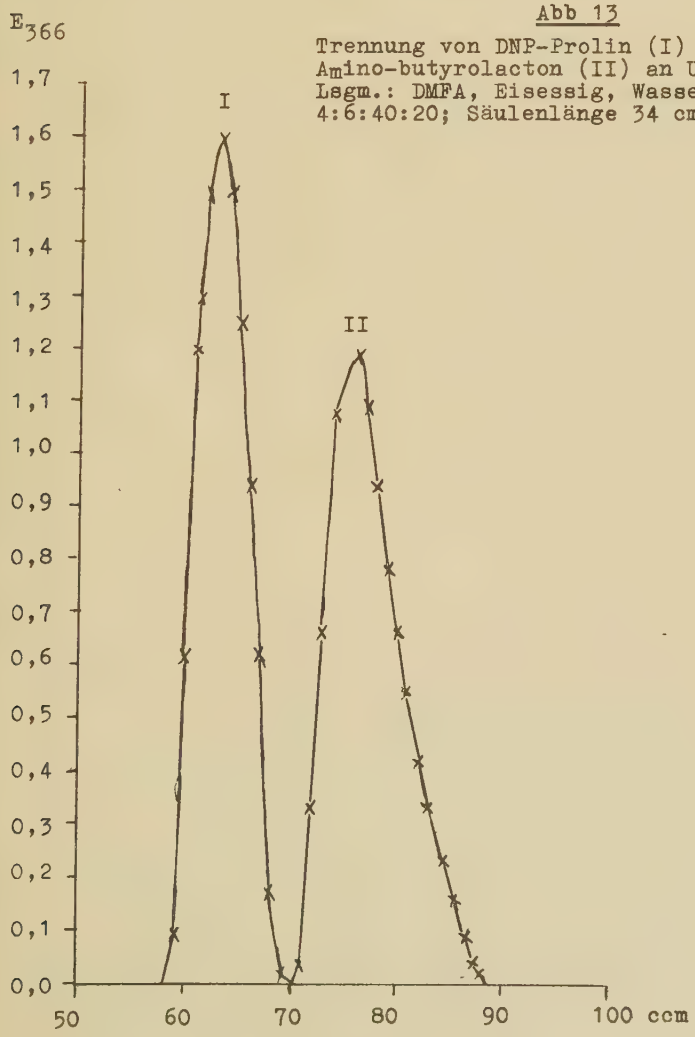
Trennung von DNP-Prolin (I) und DNP-α-aminobutyrolacton (II); Säulenlänge 31 cm, Ø 9 mm. Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser (gesättigt mit Borsäure), Alkohol 5:10:30:20



Erhöht man in dem zuerst genannten System den Wassergehalt, wobei man gleichzeitig den Gehalt an N-Dimethylformamid heruntersetzt, so gelingt auf Grund der größeren Löslichkeit des DNP-Prolins in Wasser die vollkommene Trennung beider Komponenten (s. Abb. 13).

Abb 13

Trennung von DNP-Prolin (I) und DNP-α-Amino-butyrolacton (II) an Ultramid BM: Lsgm.: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 4:6:40:20; Säulenlänge 34 cm, ø 9 mm.



Unabhängig von dieser säulenchromatographischen Trennung wurde noch eine papierchromatographische Trennung von DNP-Prolin und DNP-α-Aminobutyrolacton ausgearbeitet. Es wurde gefunden, daß das von Scanes und Tozer[57] zur Trennung von DNP-Aminosäuren verwandte Lösungsmittelgemisch sich auch sehr gut für die Trennung von DNP-Prolin und DNP-α-Aminobutyrolacton eignet.

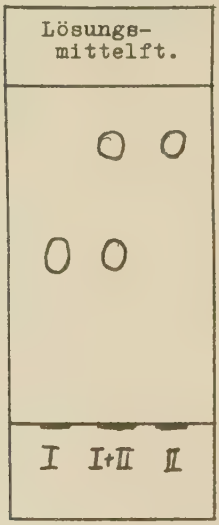


Abb. 14

Papierchromatographische Trennung von DNP-α-Aminobutyrolacton (I) und DNP-Prolin (II).

Lsgm.: tert. Amylalkohol, Phthalatpuffer pH 6, wie 4 : 1.

I: R_f = 0,47 II: R_f = 0,74

Die Flecken sind gut abgegrenzt und weisen keine Schwanzbildung auf, so daß eine quantitative Auswertung mit einem Densitometer möglich erscheint, zumal wie geprüft wurde, Transparentöl der Firma Bender & Hobein DNP-Aminosäuren nicht herauslöst. Eine säulenchromatographische Trennung an Zellulosepulver der Firma W & R Balston (Standard Grade) gelang jedoch mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch nicht.

Die Prüfung des chromatographischen Verhaltens verschiedener Aminosäuren wie DNP-Alanin, DNP-Valin u. a. ergab bei der Elution mit dem für die Trennung von DNP-Prolin und DNP-α-Amino-

butyrolacton bewährten Lösungsmittel, N-Dimethylformamid, Eisessig, Wasser und Alkohol 4 : 6 : 40 : 20 kein sehr zufriedenstellendes Bild; die Elutionskraft war merklich schwächer, d. h. die Verbindungen wanderten langsamer, und die Zonenverbreiterung war stärker. Die Erhöhung sowohl des N-Dimethylformamid- als auch des Eisessiggehaltes, bei Verminderung des wäßrigen Anteils, brachte dann die gewünschten Eigenschaften: gute Elutionswirkung bei geringer Bandenbreite.

Tabelle 5 (s. S. 28) gibt einen Überblick über das chromatographische Verhalten einiger DNP-Aminosäuren und einiger DNP-Derivate, geordnet nach fallenden R_f-Werten.

Aminosäuren, die zwei DNP-Reste enthalten, werden an Ultramid BM viel stärker adsorbiert, als die unter Tabelle 5 aufgeführten Mono-DNP-Aminosäuren. Die Elutionskraft des umseitig beschriebenen Lösungsmittels wurde daher durch Erhöhung des DMFA- und Eisessiggehaltes heraufgesetzt. Bewährt hat sich folgende Zusammensetzung: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 8:15:25:20 (Lösungsmittelgem. II).

Tabelle 6 gibt einen Überblick über das chromatographische Verhalten einiger Di-DNP-Aminosäuren.

Tabelle 6

R_f-Werte von Di-DNP-Aminosäuren an Ultramid BM. Säulenlänge 20,5 cm, Ø 9 mm; Lsgm.: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 8 : 15 : 25 : 20 (Lsgm. II).

Di-DNP-Aminosäuren	R_f-Wert
O,N-Di-DNP-l-Tyrosin	1,0
im,N-Di-DNP-Histidin	0,53
O,N-Di-DNP-Enol-asparagindial	0,34
α,δ-Di-DNP-Ornithin	0,21
α,ε-Di-DNP-Lysin	0,18

Wie man aus den Tabellen 5 und 6 ersieht, umfassen die R_f-Werte der geprüften Mono-DNP-Aminosäuren in dem Lösungsmittel I einen R_f-Wert-Bereich von 0,92 bis 0,15, die der Di-DNP-Amino-

säuren in dem sehr stark eluierendem Lösungsmittel II einen R_f-Wert-Bereich von 1,0 bis 0,18.

Tabelle 5

R_f-Werte von DNP-Aminosäuren an Ultramid BM. Säulenlänge 25 cm, Ø 9 mm; Lsgm.: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20 (Lösungsm. I)

DNP-Aminosäure	R_f-Wert
ε-DNP-l-Lysin	0,92
α-DNP-Arginin	0,86
DNP-Prolin	0,57
DNP-Threonin	0,40
DNP-Valin	0,33
DNP-Leucin	0,32
DNP-Serin	0,32
DNP-Alanin	0,31
DNP-Isoleucin	0,30
DNP-Glutaminsäure	0,27
DNP-Phenylalanin	0,26
DNP-Methionin	0,25
DNP-Asparaginsäure	0,24
DNP-Glycin	0,23
DNP-Tryptophan	0,15
DNP-Aminovalerolacton	0,55
DNP-Asparagin	0,44
DNP-Glutamin	0,39
DNP-α-Amino-δ-oxyvaleriansäure	0,34
DNP-α-Aminobutyrolacton	0,32
2.4-Dinitroanilin	0,43
2.4-Dinitrophenol	0,42

Untersuchungen zur Trennleistung der Polyamidsäule für DNP-Aminosäuren.

a) Gegenseitige Beeinflussung

Es wurde zunächst festgestellt, daß die DNP-Aminosäuren sich in ihrer chromatographischen Trennung im allgemeinen nicht gegenseitig beeinflussen. Eine Ausnahme bilden DNP-Prolin und DNP-α-aminobutyrolacton, die sich auf Grund ihrer großen R_f-Wert-Differenz von 0,25 in dem angewandten Lösungsmittel ohne weiteres hätten trennen lassen müssen. Abb. 15 (s. S. 30) zeigt eindeutig die gegenseitige Beeinflussung.

b) Zonenbreite

Eine erfolgreiche chromatographische Trennung ist weiterhin davon abhängig, in welchem Ausmaß sich die Zonen während ihrer Wanderung verbreitern. Die Abbildungen 16 (S. 31) und 17 (S.33) geben einen Überblick über die Anzahl der ccm, in denen die oben untersuchten DNP-Aminosäuren nach Verlassen einer durchlaufenden Säulenlänge von 25 cm in der Elutionslösung verteilt sind. Die Menge an DNP-Aminosäuren betrug in diesen Versuchen jeweils ca. 0,1 µMol.

Wie aus Abb. 16 und Abb. 17 zu ersehen ist, sind die Elutionsbreiten im allgemeinen verhältnismäßig gering; z. B. erscheint die eingesetzte Menge von 1,5 mg DNP-Valin im Eluat in ganzen 4 ccm!, Threonin in 5 ccm, DNP-Asparaginsäure in 6 ccm. Nicht so günstig laufen DNP-Methionin, DNP-Glutaminsäure und DNP-Prolin mit je 10 ccm und Glycin mit 12 ccm. Die Elutionskurven besitzen im allgemeinen annähernd die Form einer Gauß'schen Kurve (vergleiche die Abbildungen der nachfolgenden Trennungen), DNP-Glycin neigt jedoch ausgesprochen zur Schwanzbildung.

Die Bestimmung der effektiven Zonenverbreiterung wurde an DNP-Iso-Leucin durchgeführt, einer DNP-Aminosäure, mit einem mittelgünstigen chromatographischen Verhalten, von der ich glaube, daß sie ein objektives Bild wiedergibt. (s. Abb. 18, S. 34)

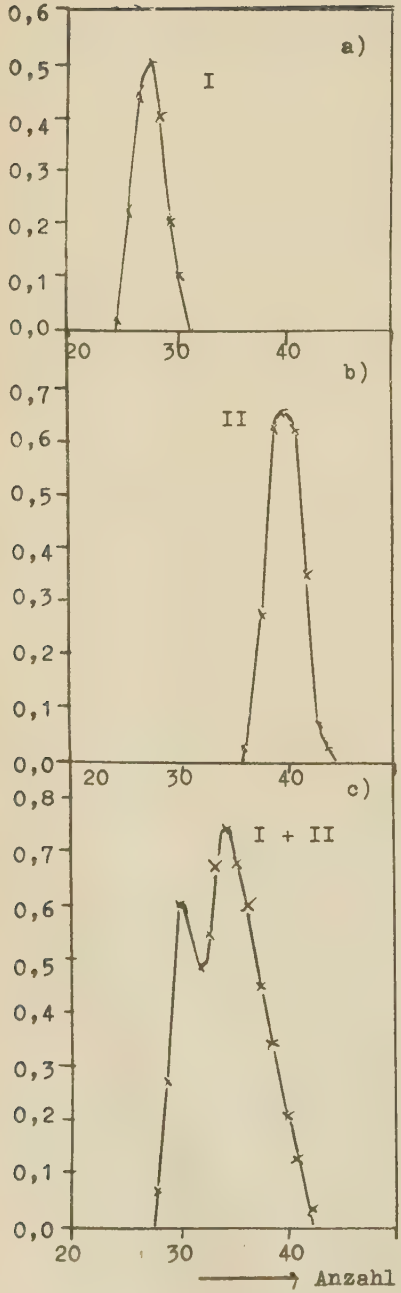


Abb. 15

Gegenseitige Beeinflussung von DNP-Prolin und DNP-α-amino-butyrolacton.

Lösgm.: DMFA, Eisessig, Wasser Alkohol 5:10:30:20

Säulenlänge: 25 cm, Ø 9 mm

aufgetragen : I) 0,21 mg

II) 0,28 mg

a) Elutionskurve des reinen DNP-Prolins

b) Elutionskurve des reinen DNP-α-aminobutyrolactons

c) Elutionskurve des Gemisches

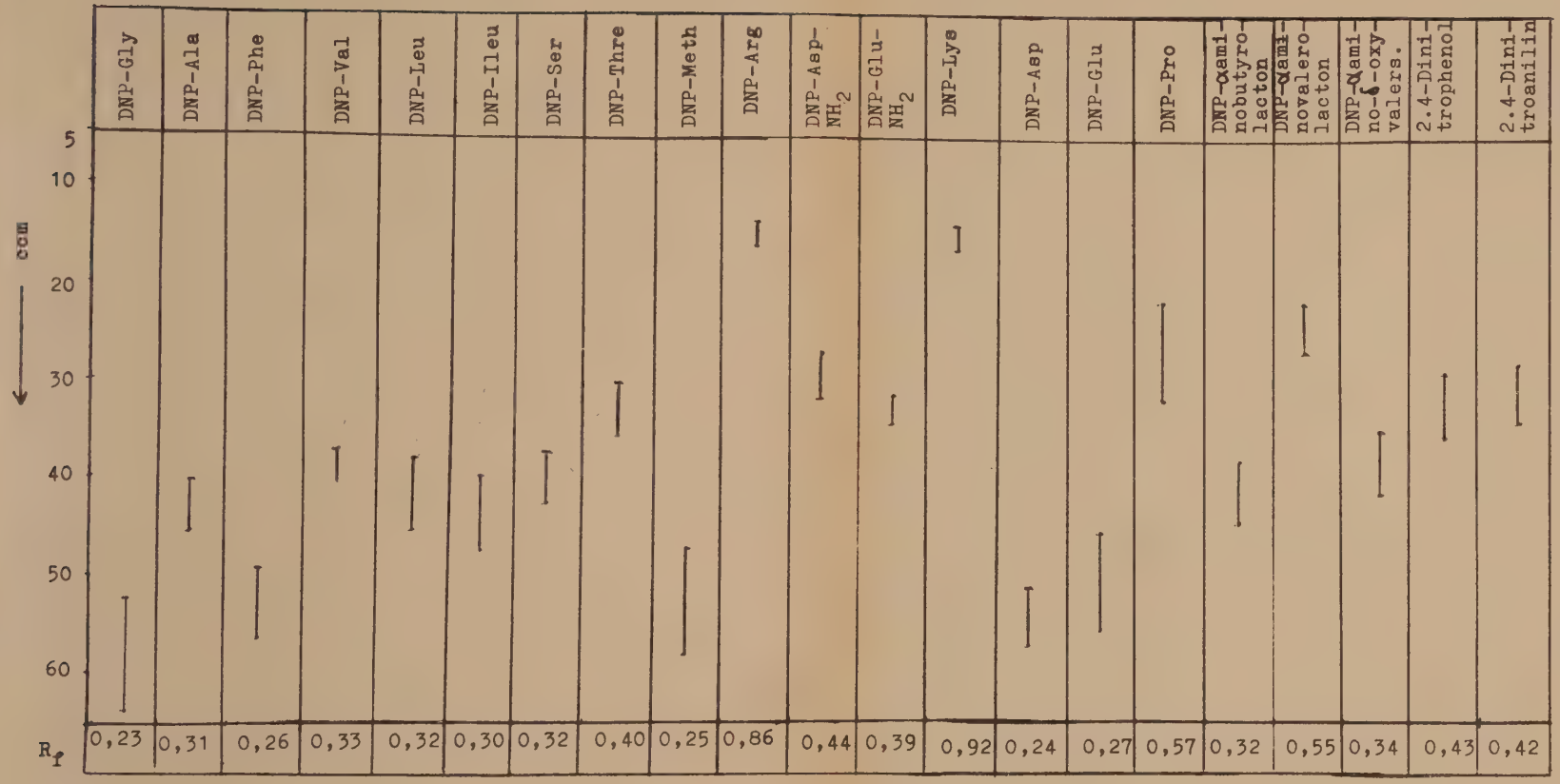


Abb. 16

Zonenbreiten und R_f-Werte von DNP-Aminosäuren, gemessen an Ultramid BM

Säulenlänge 25 cm, Ø 9 mm;

Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5:10:30:20.

Die nach Durchlaufen der Säule zur Elution der entsprechenden Verbindung benötigten ccm Lösungsmittel sind als Striche aufgetragen.

DNP-Try: Bandenbreite von 78 - 90 ccm; R_f = 0,15

Abb. 17: Zonenbreiten und R_f-Werte von Di-DNP-Aminosäuren, gemessen an Ultramid BM.

Säulenlänge 25 cm, Ø 9 mm, Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 8 : 15 : 25 : 20.

Gemessen wurden die für die entsprechende Verbindung zum Durchlaufen der Säule benötigten ccm Lösungsmittel, in denen sich die eluierte Verbindung befindet. Sie sind als Striche aufgetragen.

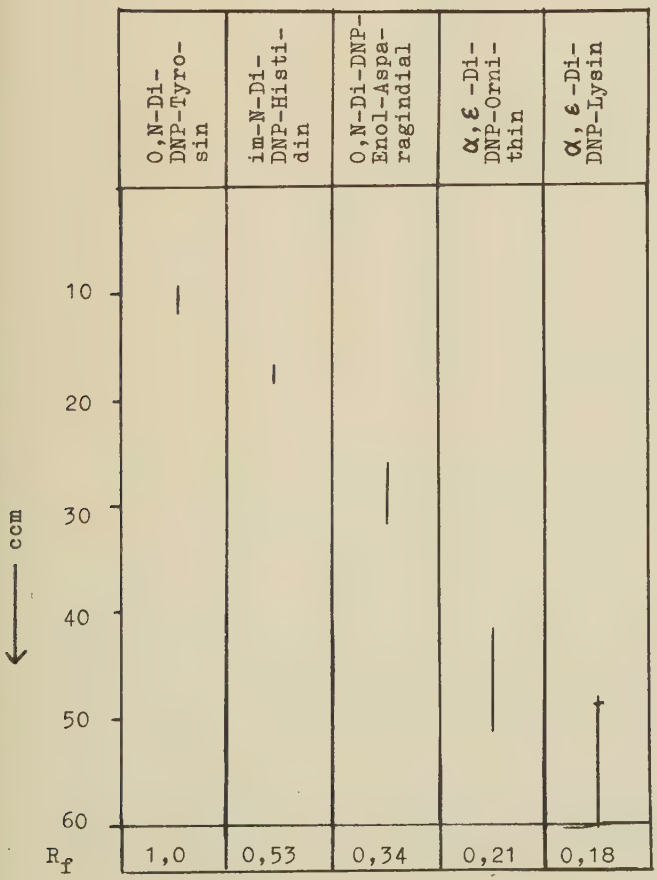
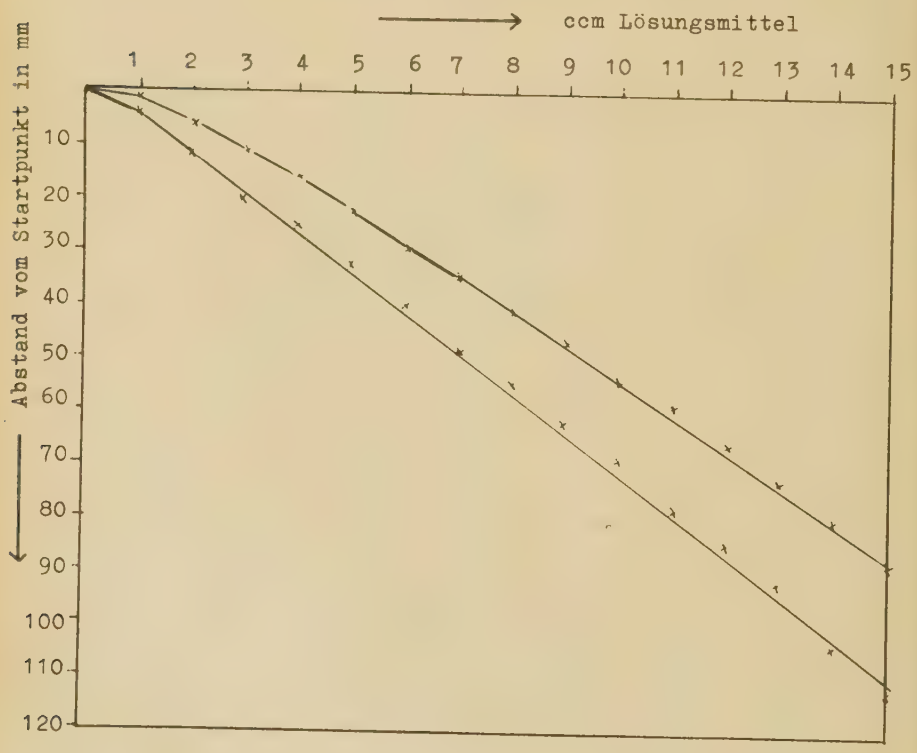


Abb. 18: Typische effektive Zonenverbreiterung von DNP-Aminosäuren an Ultramid BM.

Säulenlänge 25 cm, Ø 9 mm; Lsgm.: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5 : 10 : 30 : 20. Aufgetragen 1,5 mg DNP-Isoleucin in 0,5 ccm verg. Alkohol. Gemessen wurden jeweils nach Passieren von 1 ccm Lösungsmittelgemisch die oberen und unteren Zonenabstände in mm vom Startpunkt.



Danach ergibt sich für die durchwanderte Strecke von 5 cm eine Zonenbreite von 1,5 cm, für eine Strecke von 10 cm eine Breite von 2 cm. Green und Kay[20] geben für DNP-Threonin an Silicagel/Celite entsprechende Breiten von 2,4 und 3 cm an. Diese relativ geringe Zonenverbreiterung gestattet daher bei Verwendung von Ultramid BM die Säulenlänge weit über 25 cm zu verlängern, und damit die Trennleistung wesentlich zu erhöhen.

Für unsere Versuche empfanden wir eine Säulenlänge von 40 cm durchaus für ausreichend.

Für eine beabsichtigte Trennung von DNP-Aminosäuren ist es ferner wichtig zu wissen, welche R_f-Wert-Differenz zwischen den zu trennenden Verbindungen für eine exakte Trennung noch zulässig ist. In Tabelle 6 (s. S. 36) sind die Ergebnisse von Trennversuchen an einer Reihe von Substanzpaaren von DNP-Aminosäuren zusammengestellt, die den in Tabelle 6 genannten Abbildungen entnommen sind.

Wie man sieht, genügt für die Trennung von DNP-Aminosäuren bei einer durchschnittlichen Säulenlänge von 35 - 40 cm eine R_f-Wert-Differenz von 0,07 - 0,09. Die Angabe des R_f-Wert-Bereiches zeigt, daß es sich hier sämtlich um langsam laufende DNP-Aminosäuren handelt, die von Natur aus eine stärkere Bandenverbreiterung zeigen, als schneller laufende. Für den R_f-Wert-Bereich von 0,40 - 0,60 kann man daher ruhig eine geringere R_f-Wert-Differenz in Betracht ziehen, nämlich 0,04 - 0,06. Berücksichtigt man noch die z. B. bei der Trennung von DNP-Valin und DNP-Phenylalanin weite Spanne von 20 ccm reinen Elutionsmittels zwischen den eluierten Banden, so kann man mit gutem Gewissen auch hier die notwendige R_f-Wert-Differenz geringer als 0,07 setzen.

Die zur Trennung benötigte R_f-Wert-Differenz kann in einzelnen Fällen durch Hintereinander-schalten verschiedener Elutionsmittel stark verringert werden. Abb. 19 (s. S. 37/38) zeigt die Auftrennung von 7 DNP-Verbindungen an Ultramid BM.

Die schnell wandernden DNP-Verbindungen, wie α-DNP-Arginin, DNP-Valerolacton und 2.4-Dinitroanilin wurden zunächst mit DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol = 4 : 6 : 40 : 20, also mit einem Elutionsmittel von geringer Elutionskraft eluiert. Nach 140 ccm Eluat wurde die Zusammensetzung des Lösungsmittels kontinuierlich geändert bis zum konstanten Verhältnis DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol = 5 : 10 : 30 : 20. DNP-Prolin, DNP-Valin, DNP-Alanin und DNP-Phenylalanin erscheinen darauf in wohlabgesetz-

Tabelle 6

Trennung einer Reihe von DNP-Aminosäurepaaren

Abb.	Getrennte DNP-Aminosäurepaare	R_f-Werte d. beid. Komponenten	cm Säulenlänge	ccm Elutionsmittel zwischen d. Band.	R_f-Wertdiff.
19	DNP-Valin/DNP-Alanin	0,33/0,31	37	--	0,02
26	DNP-Threonin/DNP-Serin	0,40/0,32	40	--	0,08
26	DNP-Serin/DNP-Methionin	0,32/0,25	40	8	0,07
20	DNP-Threonin/DNP-Alanin	0,40/0,31	35	3	0,09
22	DNP-Valin/DNP-Asparaginsäure	0,33/0,24	29	9	0,09
30	DNP-Valin/DNP-Phenylalanin	0,33/0,26	40	20	0,07

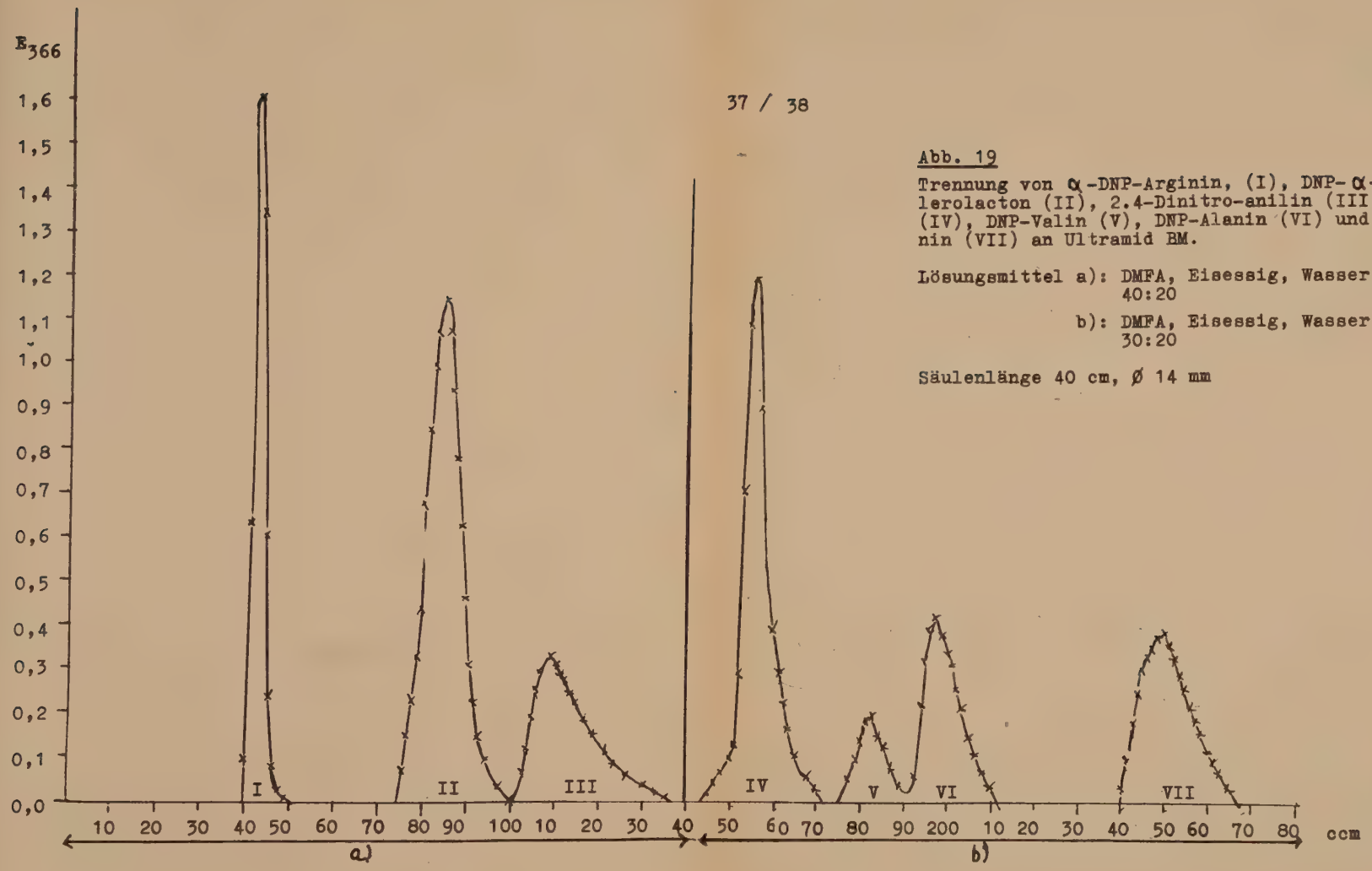


Abb. 19

Trennung von α-DNP-Arginin, (I), DNP-α-Amino-δ-valerolacton (II), 2.4-Dinitro-anilin (III), DNP-Prolin (IV), DNP-Valin (V), DNP-Alanin (VI) und DNP-Phenylalanin (VII) an Ultramid BM.

Lösungsmittel a): DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 4:6: 40:20

b): DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5:10: 30:20

Säulenlänge 40 cm, ø 14 mm

ten Banden. DNP-Valin und DNP-Alanin unterscheiden sich in ihren R_f-Werten nur um 0,02 und können doch einwandfrei getrennt werden.

Verwendbarkeit von Lösungsmitteln

Es wurde gefunden, daß sich in dem bisher verwendeten Lösungsmittelgemisch, DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5:10:30:20 N-Dimethylformamid durch andere polare Lösungsmittel, wie Formamid, Polyäthylenglykolmonoäthyläther, Methylcellosolve+) und Methylcarbitol+) ersetzen läßt. Ebenso kann Ameisensäure an Stelle von Eisessig und Methanol, Propanol und Aceton an die Stelle von Äthanol treten. Es steht also für die Trennung von DNP-Aminosäuren - das gleiche gilt für die Trennung von DNP-Peptiden - ein ganzes Spektrum von neuartigen Lösungsmittelgemischen zur Verfügung. Tabelle 7 (s. S. 40) gibt einen Überblick über das Elutionsvermögen von neun verschiedenen Lösungsmittelsystemen, geprüft am Beispiel DNP-Alanin.

Legt man als Maßstab für einen Vergleich der Brauchbarkeit der Elutionsmittel R_f-Wert und Bandenbreite von DNP-Alanin im Lösungsmittel der Zusammensetzung 1 zugrunde, so ergibt sich folgendes:

Polyäthylenglykoläthyläther (Nr. 2) an Stelle von N-Dimethylformamid bewirkt eine starke Verringerung der Bandenbreite von DNP-Alanin bei annähernd gleichem R_f-Wert (0,54). Ein gleiches Ausmaß der Bandenverengung erreicht man durch Ersatz des Eisessigs durch Ameisensäure; der R_f-Wert steigt aber um 0,12 an.

Methylcarbitol (Nr. 4), Formamid (Nr. 5), Propanol (Nr. 8) und Aceton (Nr. 9) (die beiden letzteren an Stelle von Alkohol) führen zu einer erheblichen Verringerung des R_f-Wertes; die Bandenbreite bleibt etwas unter dem Standard (Nr. 1).

+) An Stelle der korrekten Nomenklatur werden der Kürze halber diese Trivialnamen benützt:

Methylcellosolve = Glycolmonomethyläther

Methylcarbitol = Diglycolmonomethyläther

Tabelle 7

Vergleichende chromatographische Untersuchungen: Beziehungen zwischen dem Elutionsvermögen verschiedener Lösungsmittel.

Zur Ermittlung dieser Tabellenwerte wurde das Lösungsmittel 1 als Grundlage gewählt und jeweils um eine Komponente geändert.

Nr.	Lösungsmittel				Zusammensetzung	pH	Elut.breite in ccm	R_f-Wert
1	DMFA	Eisessig	H_2O	Äthanol	5 10 30 20	3,1	15	0,55
2	Polyäthylenglycolmonoäthyläther	"	"	"	5 10 30 20	2,8	8	0,54
3	Methylcellosolve	"	"	"	5 10 30 20	2,9	15	0,43
4	Methylcarbitol	"	"	"	5 10 30 20	2,9	14	0,44
5	Formamid	"	"	"	5 10 30 20	3,1	12	0,51
6	DMFA	Ameisens.	"	"	5 10 30 20	2,2	8	0,67
7	DMFA	Eisessig	"	Methanol	5 10 30 20	2,6	22	0,37
8	DMFA	"	"	Propanol	5 10 30 20	2,8	13	0,54
9	DMFA	"	"	Aceton	5 10 30 20	2,8	13	0,48

Standard:
Säule mit Hahn und Glaswollepfropfen, Säulenlänge 26 cm, Ø 14 mm; der R_f-Wert wurde jeweils auf Kupfertetraminsulfat bezogen. Aufgetragene Menge an DNP-Alanin, jeweils 2,0 mg.

Spalte 2 gibt die Breite der jeweiligen Bande an, ausgedrückt durch die Zahl der Gläschen, welche im Eluat DNP-Alanin enthalten. Für jedes Lösungsmittel wurde eine neue Säule benutzt.

Die Verwendung von Methylcellosolve (3) bewirkt bei gleicher Bandenbreite eine R_f-Wert-Verringerung von 0,12, während die Benutzung von Methanol (7) an Stelle von Äthanol sich sehr ungünstig sowohl auf die Bandenbreite (Zunahme um 7 ccm) als auch auf den R_f-Wert (Abnahme um 0,18) auswirkt (zur Wirkungsweise dieser Lösungsmittel siehe Seite 85). Für die praktische Durchführung von Trennungen ergibt sich dabei folgendes:

Lösungsmittelgemische, die N-Dimethylformamid enthalten - die Mehrzahl der Versuche wurden mit ihm durchgeführt - sind im allgemeinen brauchbar. Polyäthylenglykolmonoäthyläther besitzt aber gegenüber N-Dimethylformamid wegen der geringeren Bandenverbreiterung einige Vorteile. Allerdings quillt Polycaprolactam beträchtlich, so daß nur mit sehr geringen Strömungsgeschwindigkeiten gearbeitet werden kann. Alle übrigen aufgeführten Lösungsmittel (3,4,5,6,8,9) empfehle ich für Spezialzwecke, wenn z. B. bei sehr langsam laufenden Substanzen ein größerer R_f-Wert erwünscht ist (Verwendung von Ameisensäure) oder bei zu schnell laufenden Substanzen Benutzung von Methylcarbitol (Nr. 4).

Im folgenden sei anhand einiger Trennbeispiele die Brauchbarkeit einiger Lösungsmittelsysteme, die an Stelle von N-Dimethylformamid andere Komponenten enthalten, aufgezeigt; so in Abb. 20 (s. S. 42) die Verwendung von Polyäthylenmonoäthyläther, in Abb. 21 (s. S. 43) die Verwendung von Methylcarbitol und in Abb. 22 (s. S. 43) die Verwendung von 1.4-Butandioldiglycidäther.

DNP-Peptide

Die Versuche zeigten, daß auch DNP-Peptide von Polycaprolactam fest adsorbiert werden. Ihre Elution gelingt ohne sehr starke Bandenverbreiterung mit demselben Lösungsmittel wie bei DNP-Aminosäuren: N-Dimethylformamid, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20. Im folgenden seien die R_f-Werte einer Reihe von DNP-Peptiden angegeben, wie sie an Ultramid BM mit diesem Lösungsmittel erhalten wurden. Die Arbeitsmethodik ist die gleiche, wie sie

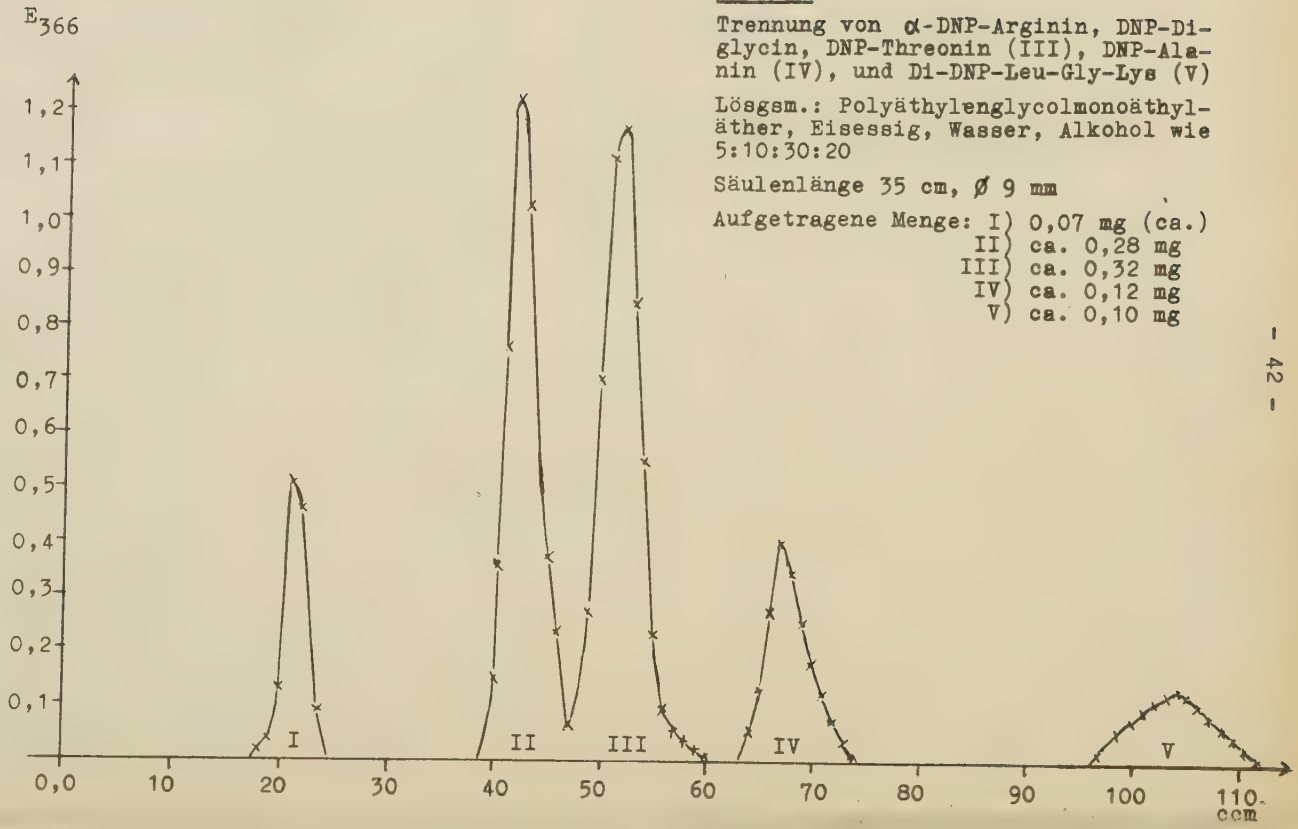


Abb. 20

Trennung von α-DNP-Arginin, DNP-Diglycin, DNP-Threonin (III), DNP-Alanin (IV), und Di-DNP-Leu-Gly-Lys (V)

Lösgsm.: Polyäthylenglycolmonoäthyläther, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20

Säulenlänge 35 cm, Ø 9 mm

Aufgetragene Menge: I) 0,07 mg (ca.)
II) ca. 0,28 mg
III) ca. 0,32 mg
IV) ca. 0,12 mg
V) ca. 0,10 mg

Abb. 21

Trennung von DNP-Threonin (I) und DNP-Asparaginsäure (II).

Lösungsmittel: 1.4-Butandioldiglycidäther, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20

Säulenlänge 26 cm, ø 9 mm

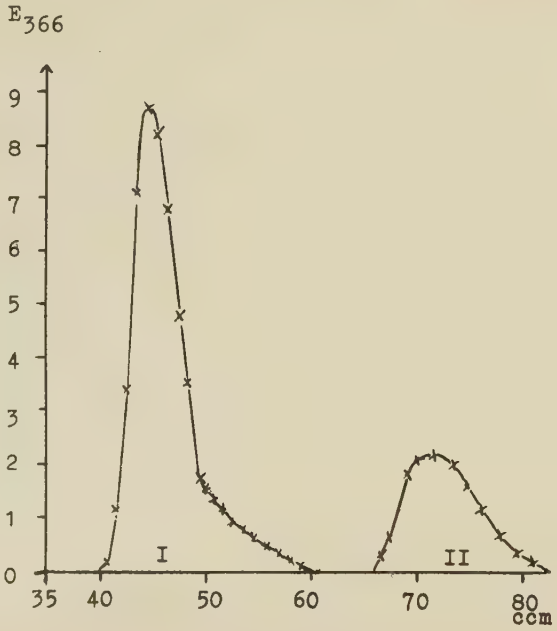
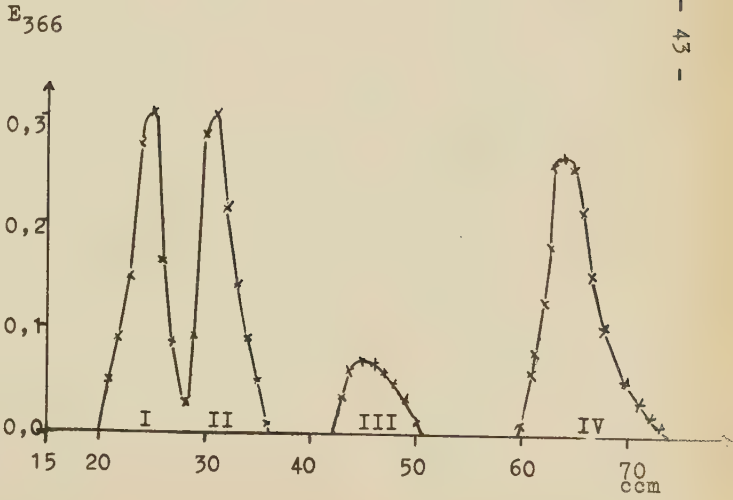


Abb. 22

Trennung von DNP-Valinol (I), 2.4-Dinitroanilin (II), DNP-Valin (III) und DNP-Asparaginsäure (IV).

Lösungsmittel: Methylcarbitol, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20

Säulenlänge 29 cm, ø 9 mm



für DNP-Aminosäuren beschrieben wurde.

Tabelle 8

R_f-Werte von einigen DNP-Peptiden an Ultramid BM. Säulenlänge 25 cm, Ø 9 mm; Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20; Retentionsvolumen 12 ccm; aufgetragene Menge ca. 0,1 µMol.

DNP-Peptid	R_f-Wert
DNP-Leu-Digly-OH	0,63
DNP-Pro-Gly-Phe-OH	0,60
DNP-Digly-OH	0,57
DNP-Gly-Phe-Glu-OH	0,52
Di-DNP-Leu-Gly-Lys-OH	0,24

Eine Übersicht über die entsprechenden Zonenbreiten gibt Abb. 23 (s. S. 45).

Wie man aus dieser Abb. 23 ersieht, erscheinen auch hier die eluierten DNP-Peptide in wohlabgegrenzten Banden von relativ geringer Breite. Zieht man jedoch zum Vergleich die R_f-Werte der entsprechenden DNP-Aminosäuren heran, so sieht man, daß die Affinität gegenüber DNP-Peptiden stark nachläßt. DNP-Glycin besitzt einen R_f-Wert von 0,23, DNP-Diglycin 0,57 und DNP-Leucyldiglycin sogar 0,63. DNP-Glycyl-phenylalanyl-glutaminsäure hat einen R_f-Wert von 0,52! (DNP-Glutaminsäure 0,27, DNP-Phenylalanin 0,26 und DNP-Glycin 0,23). Es läßt sich auf Grund der wenigen Beispiele nicht sagen, ob eine Beziehung zwischen chromatographischem Verhalten und der Länge der Peptidkette besteht, solange in der Peptidkette keine zusätzliche Haftstelle vorhanden ist. Schroeder und Honen[58] konnten bei ihren Versuchen keinen klaren Zusammenhang zwischen Kettenlänge und Haftfestigkeit von DNP-Peptiden ersehen. Das Vorkommen zusätzlicher Haftstellen im gleichen Peptid erhöht die Haftfestigkeit jedoch erheblich: So besitzt Di-DNP-leucyl-glycyl-lysin einen R_f-Wert von 0,24.

Abb. 23

Zonenbreiten und R_f-Werte einiger DNP-Peptide, gemessen an Ultramid BM.

Säulenlänge: 25 cm, Ø 9 mm; Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20.

Die ccm Lösungsmittel, in denen sich das DNP-Peptid nach der Elution befindet, sind als Striche aufgetragen.

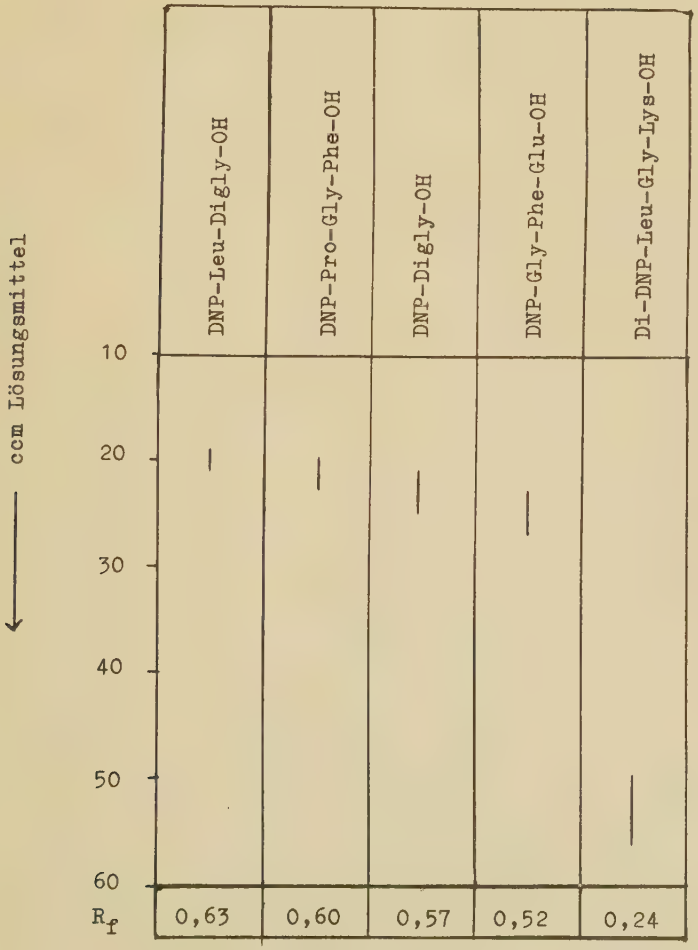


Tabelle 9 gibt einen Überblick über Trennversuche an einer Reihe von Substanzpaaren. Danach kann man sagen, daß für einen mittleren R_f-Wert-Bereich von 0,50 - 0,65 bei einer Säulenlänge von 40 cm eine R_f-Wert-Differenz von 0,06 für eine vollständige Trennung genügt. Da weitere DNP-Peptide nicht zur Verfügung standen, mußte auf eine größ-ere Anzahl von Beispielen verzichtet werden.

In den Abbildungen 24 (S. 46), 25 (S. 48) und 26 (S. 49) sind die Ergebnisse der in Tabelle 9 genannten und einiger weiterer Substanzen wiedergegeben.

Abb. 24

Trennung von DNP-Pro-Gly-Phe und DNP-Gly-Phe-Glu (II).

Säulenlänge 36 cm, Ø 9 mm; Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20.
Aufgetragene Menge: I = ca. 0,40 mg, II = 0,38 mg

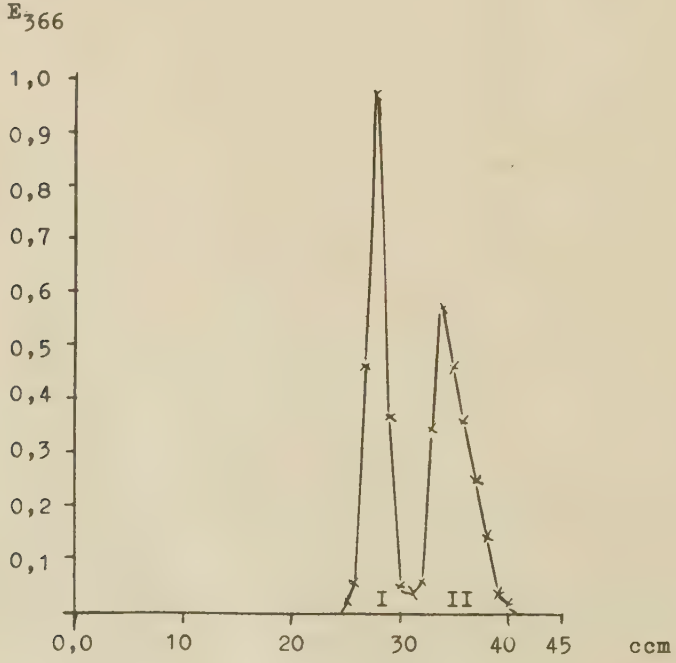


Tabelle 9

Trennung einer Reihe von DNP-Paptidpaaren.

Abb.	Getrennte DNP-Peptidpaare	R_f-Werte d. beid. Komponenten	Säulenlänge in cm	ccm Elutionsmittel zwischen d. Band.	R_f-Wertdiff.
25	DNP-Leu-Digly/DNP-Digly	0,63/0,57	40	1	0,06
24	DNP-Pro-Gly-Phe/ DNP-Gly-Phe-Glu	0,60/0,52	36	-	0,08
31	DNP-Leu-Digly/ DNP-Gly-Phe-Glu	0,63/0,52	30	-	0,11

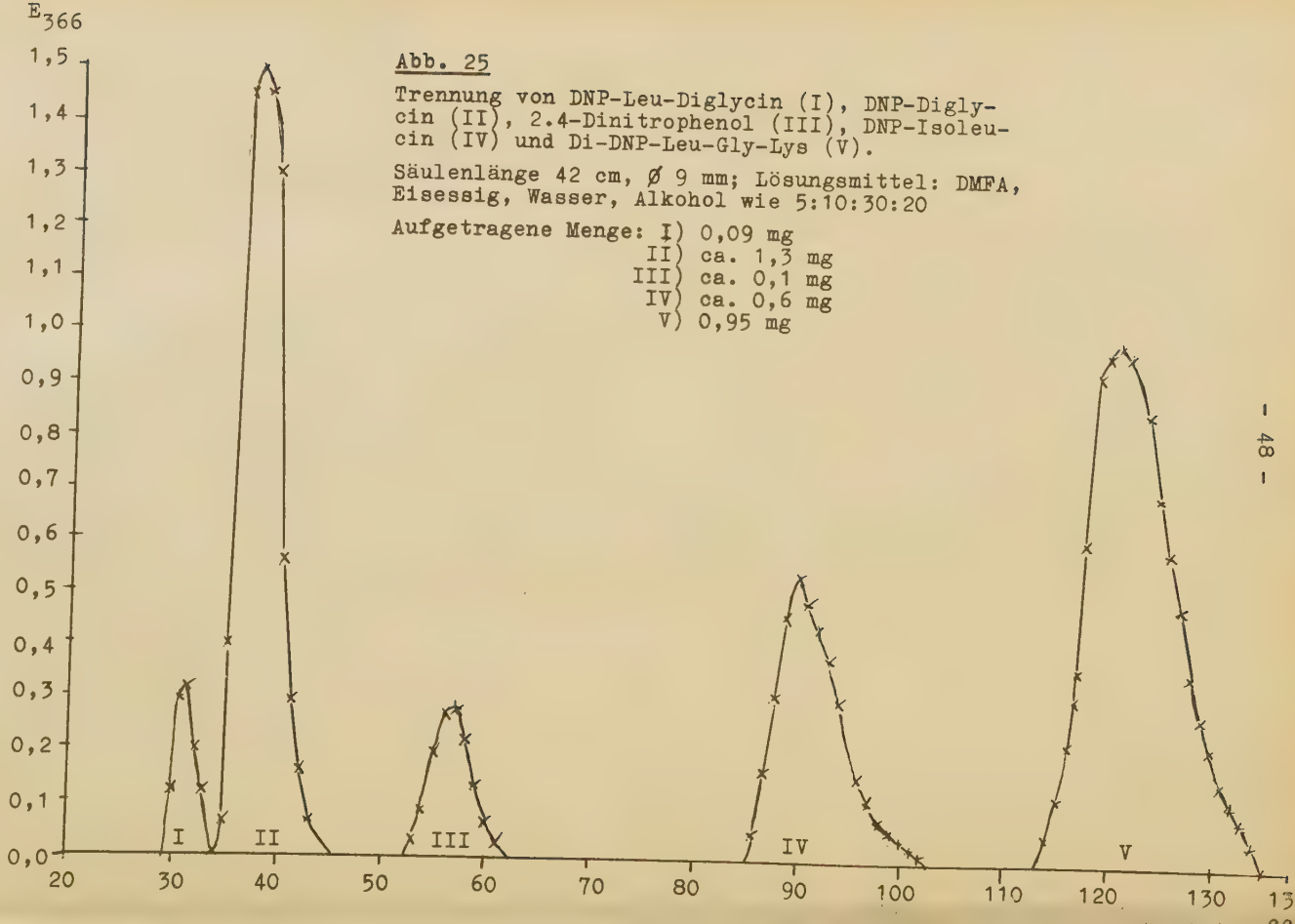


Abb. 25

Trennung von DNP-Leu-Diglycin (I), DNP-Diglycin (II), 2.4-Dinitrophenol (III), DNP-Isoleucin (IV) und Di-DNP-Leu-Gly-Lys (V).

Säulenlänge 42 cm, Ø 9 mm; Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20

Aufgetragene Menge: I) 0,09 mg
II) ca. 1,3 mg
III) ca. 0,1 mg
IV) ca. 0,6 mg
V) 0,95 mg

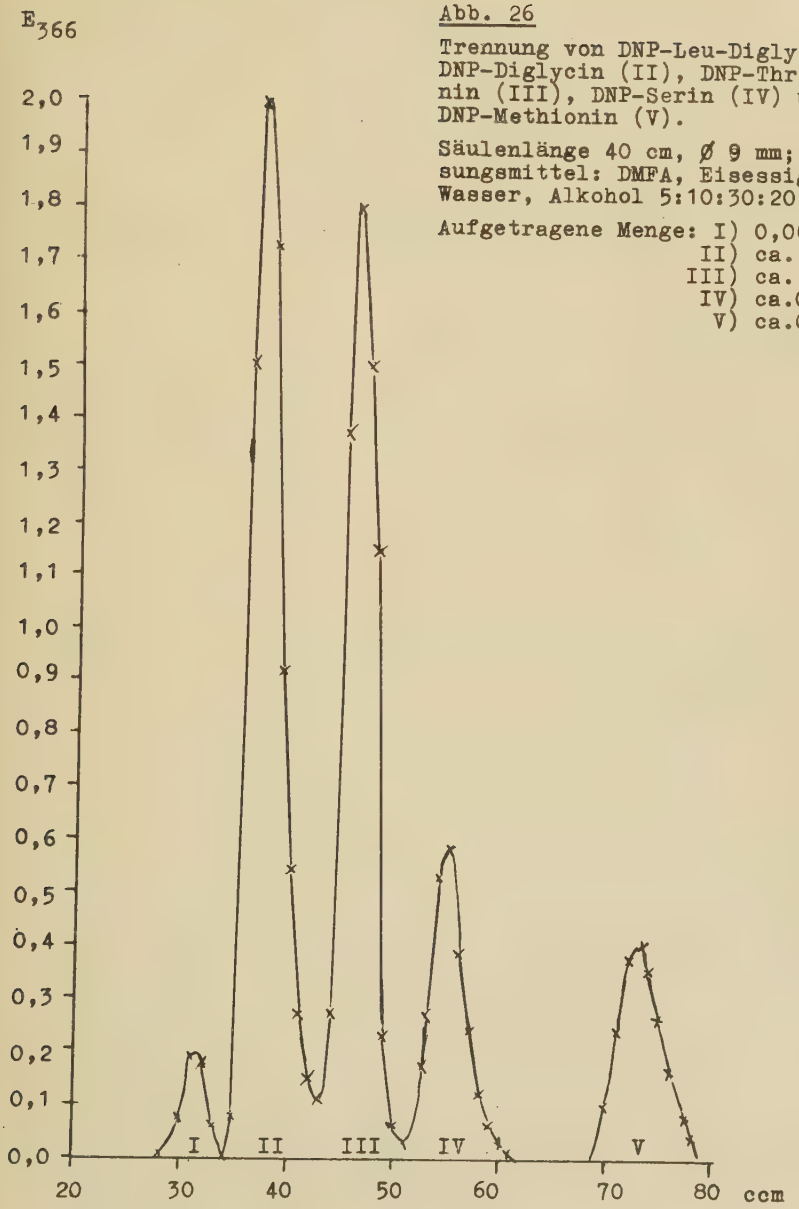


Abb. 26

Trennung von DNP-Leu-Digly (I), DNP-Diglycin (II), DNP-Threonin (III), DNP-Serin (IV) und DNP-Methionin (V).

Säulenlänge 40 cm, Ø 9 mm; Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5:10:30:20

Aufgetragene Menge: I) 0,06 mg
II) ca. 1,4 mg
III) ca. 1,2 mg
IV) ca.0,25 mg
V) ca.0,30 mg

Wie man aus Abb. 25 und Abb. 26 ersieht, stören anwesende DNP-Aminosäuren die Trennung von DNP-Peptiden nicht, sofern sie nicht die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit besitzen. Ebenso behält 2.4-Dinitrophenol seinen R_f-Wert bei. In großen Konzentrationsunterschieden vorliegende Substanzpaare werden gut getrennt, auch wenn ihre R_f-Werte nahe beieinander liegen, siehe das Substanzpaar DNP-leucyl-diglycin/DNP-diglycin (Abb. 26). Bemerkenswert ist auch die Trennung von DNP-Serin, DNP-Threonin und DNP-Methionin in einem Arbeitsgang (Abb. 26).

DNP-Aminoalkohole

Schon die ersten chromatographischen Versuche an Ultramid BM erbrachten, daß DNP-Aminoalkohole kein so günstiges säulenchromatographisches Verhalten zeigten, wie die eingangs geprüften DNP-Aminosäuren und DNP-Peptide . Tabelle 10 gibt die R_f-Werte einiger DNP-Aminoalkohole wieder, eluiert mit DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20.

Tabelle 10

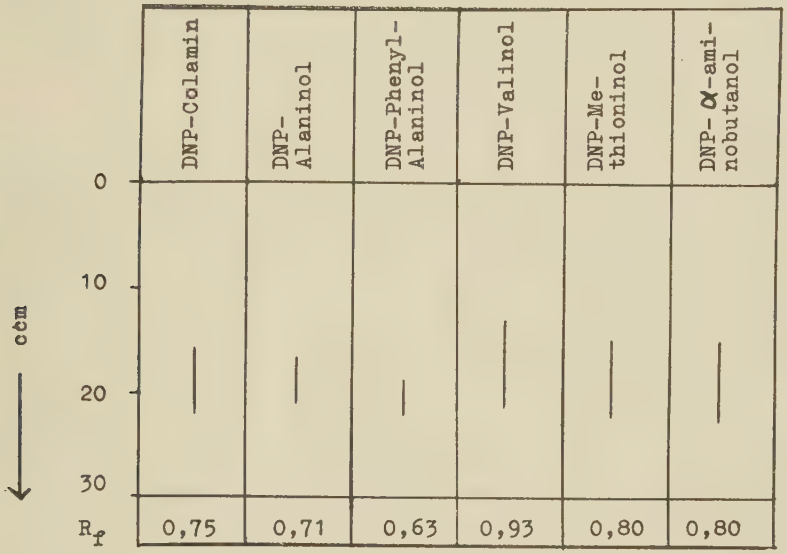
R_f-Wert einiger DNP-Aminoalkohole an Ultramid BM. Säulenlänge 25 cm, Ø 9 mm; Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20.

DNP-Aminoalkohol	R_f-Wert
DNP-Valinol	0,93
DNP-Methioninol	0,80
DNP- α-Aminobutanol	0,80
DNP-Colamin	0,75
DNP-Alaninol	0,71
DNP-Phenylalaninol	0,63

Abb. 27 (s. S. 51) gibt die dazugehörigen Zonenbreiten wieder.

Abb. 27

Zonenbreiten von DNP-Aminoalkoholen. Säulenlänge 25 cm, Ø 9 mm; Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5 : 10 : 30 : 20.



Wie man sieht, werden die DNP-Aminoalkohole selbst bei sehr hohen R_f-Werten in sehr breiten Zonen eluiert. Außerdem war trotz der Unterschiede in den R_f-Werten infolge der enormen Zonenverbreiterung keine Trennung möglich. Auch Variation der Lösungsmittelzusammensetzung (weniger DMFA und weniger Eisessig) ergab kein besseres Bild.

Auch wasserfreie Lösungsmittelgemische wie Ligroin, Eisessig, Aceton 60 : 20 : 20 wurden mit schlechtem Erfolg angewendet. Aus diesem Grunde wurde von einer weiteren Untersuchung Abstand genommen, da ich überzeugt bin, daß ein säulenchromatographisches Trennverfahren an Ultramid BM gegenüber den bisherigen Methoden keinen Fortschritt bringen würde.

Grundsätzlich ist es möglich, DNP-Aminoalkohole von DNP-Aminosäuren an Ultramid BM zu trennen, da DNP-Aminoalkohole mit sehr hohen R_f-Werten laufen. Wie man aus Abb. 22 (s. S. 43) ersieht, stören DNP-Aminoalkohole die Trennung von DNP-Aminosäuren nicht (Trennung von DNP-Valinol und DNP-Valin). In der Praxis wird man aber immer die DNP-Aminoalkohole durch Extraktion der alkalischen wäßrigen Lösung mit einem organischen Lösungsmittel entfernen.

Quantitative Trennbeispiele

Um zu sehen, ob die an Ultramid BM aufgetragenen DNP-Verbindungen auch quantitativ wieder eluiert werden können, wurden die im folgenden beschriebenen Trennungen quantitativ durchgeführt. Die Arbeitsmethodik blieb die gleiche, wie sie auf den Seiten 11 und 12 beschrieben wurde.

Am Beispiel des DNP-Threonins wurde zunächst einmal untersucht, ob eine unterschiedliche Belastung der Ultramid BM-Säule sich stark auf die Verteilung des Eluates in den einzelnen Gläschen auswirkt. So wurden (s. S. 53, Abb. 28) 2,85 mg, 0,28 mg, 0,14 mg und 0,07 mg DNP-Threonin in Abständen auf die gleiche Ultramid BM-Säule (31,4 cm Länge, 9 mm Durchmesser) gegeben. Wie man sieht, erhält man in jedem Falle eine wohlausgebildete Glockenkurve. Bei kleineren Mengen wird die Glockenkurve etwas flacher, der R_f-Wert ist jedoch von der Konzentration unabhängig.

Für die Untersuchung der anderen in Tabelle 11 (s. S. 54) aufgeführten Verbindungen wählte ich Mengen, die etwa in der Grössenordnung von 0,5 mg je Komponente lagen, da in diesem Falle die Höhe der Extinktion sich im linearen Bereich befindet.

In Tabelle 11 (s. S. 54) sind die aufgetragenen mit denen der eluierten DNP-Mengen verglichen. Der prozentuale Fehler wurde auf die aufgetragene Menge bezogen. Wie man sieht, hat man etwa mit einem mittleren Fehler von 5 % zu rechnen. Zurückgehalten wird praktisch nichts.

Abb. 28

Chromatographisches Verhalten von DNP-Threonin in Abhängigkeit von der aufgebrachten Menge.

Es wurden aufgetragen: I 2,85 mg, II 0,28 mg, III 0,14 mg, IV 0,07 mg.

Zum Kolorimetrieren wurde der Gläscheninhalt (I 4 ccm, II 4 ccm, II 3 ccm und IV 3 ccm) mit Alkohol auf ein Volumen von I 16 ccm, II 8 ml, III 5 ccm, IV 3ccm verdünnt.

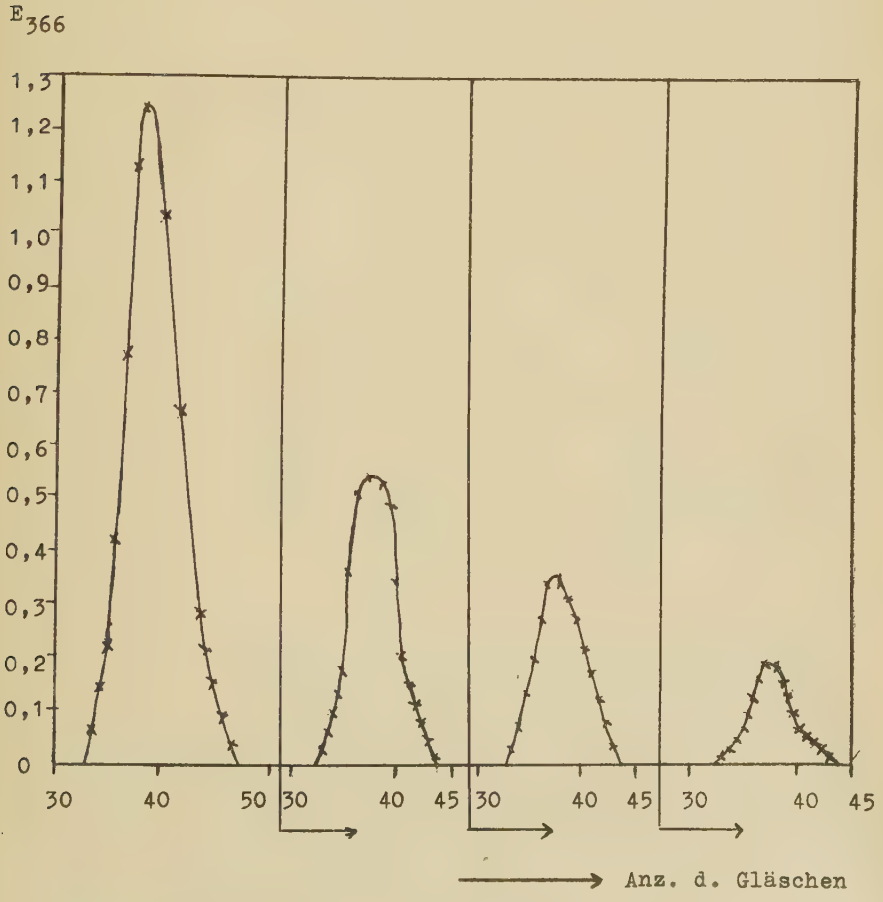


Tabelle 11

Vergleich der eingesetzten und der eluierten DNP-Mengen in mg

Abb.	Substanz	aufgetragene Menge in mg	zurückgewon. Menge in mg+)	Fehler in %
28	DNP-Threonin	0,07	0,069	0
	DNP-Threonin	0,14	0,135	-0,4
	DNP-Threonin	0,28	0,292	+4,3
	DNP-Threonin	2,85	2,800	-2,5
29	DNP-Prolin	0,33	0,321	-2,7
	DNP-α-aminobutyrolacton	0,26	0,278	+6,9
30	α-DNP-Arginin	0,32	0,338	+5,6
	DNP-Prolin	0,56	0,540	-3,5
	DNP-Valin	0,35	0,350	0
	DNP-Phenylalanin	0,66	0,690	+4,5
31	DNP-Leu-Digly	0,37	0,354	-4,3
	DNP-Gly-Phe-Glu	0,52	0,520	0
	Di-DNP-Leu-Gly-Lys	0,59	0,589	0

+) errechnet nach: Menge in mg = $\frac{ccm}{\varepsilon} \sum E$

ε =Extinktion von 0,1 µMol in 1 ccm

ccm=ccm-Inhalt eines Gläschens

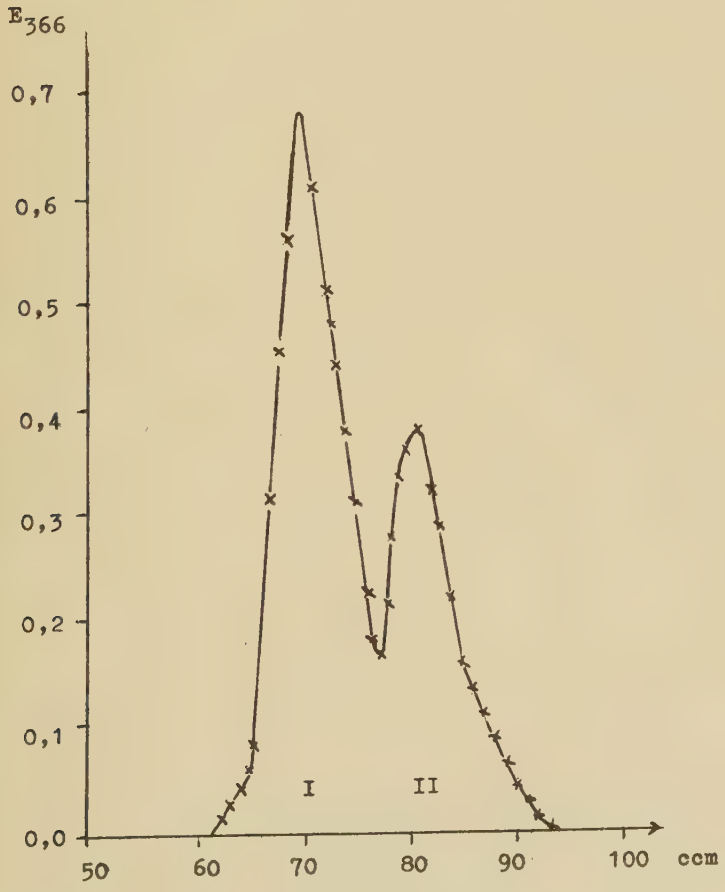
E =gemessene Extinktion

Abb. 29

Versuch zur quantitativen Trennung von DNP-Prolin und DNP-α-aminobutyrolacton (II).

Säulenlänge 36 cm, Ø 9 mm. Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 4:6:40:20.

Aufgebrachte Menge: DNP-Prolin (I) 0,33 mg
DNP-α-aminobutyrolacton (II) 0,26 mg



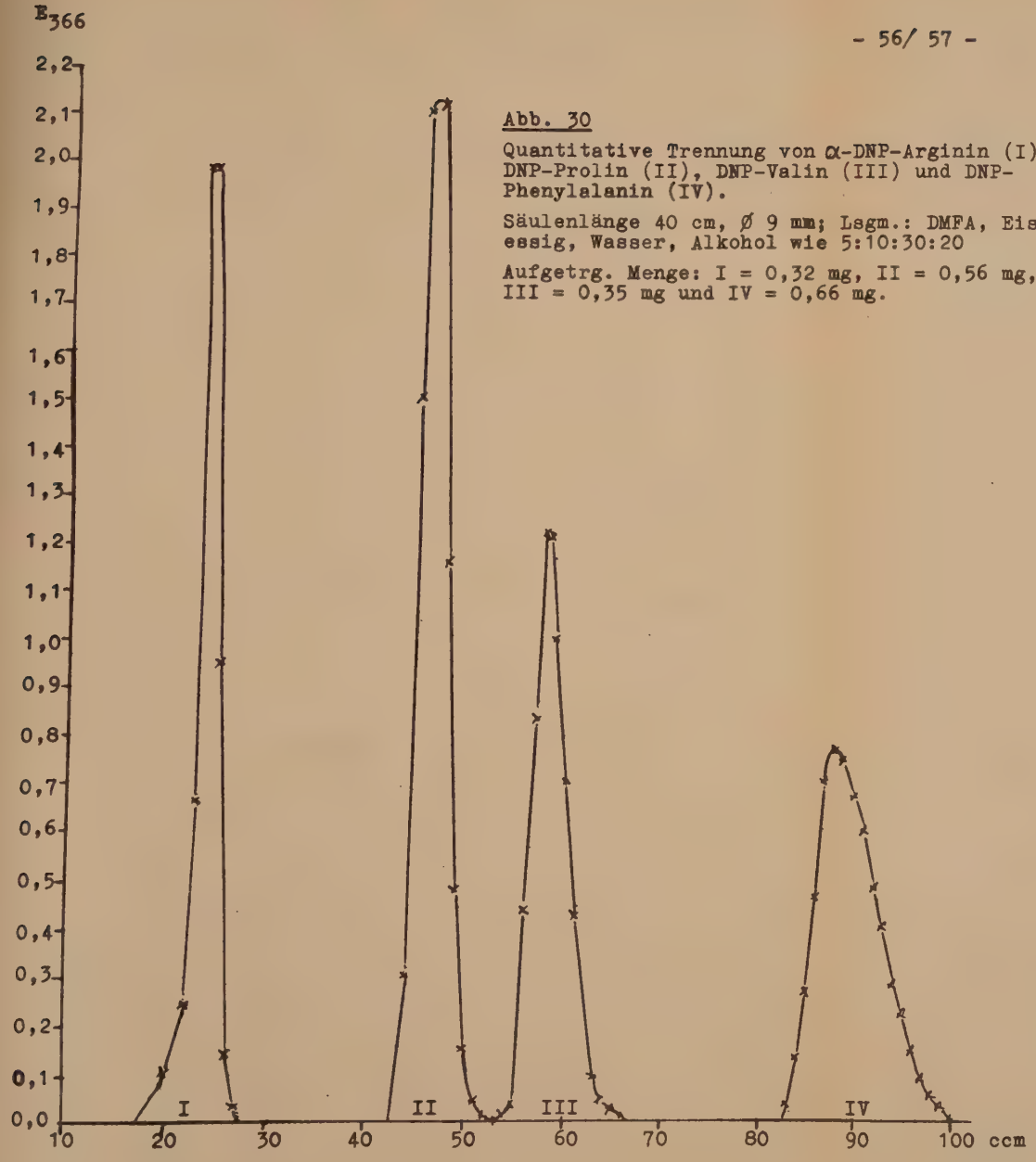


Abb. 30

Quantitative Trennung von α-DNP-Arginin (I) DNP-Prolin (II), DNP-Valin (III) und DNP-Phenylalanin (IV).

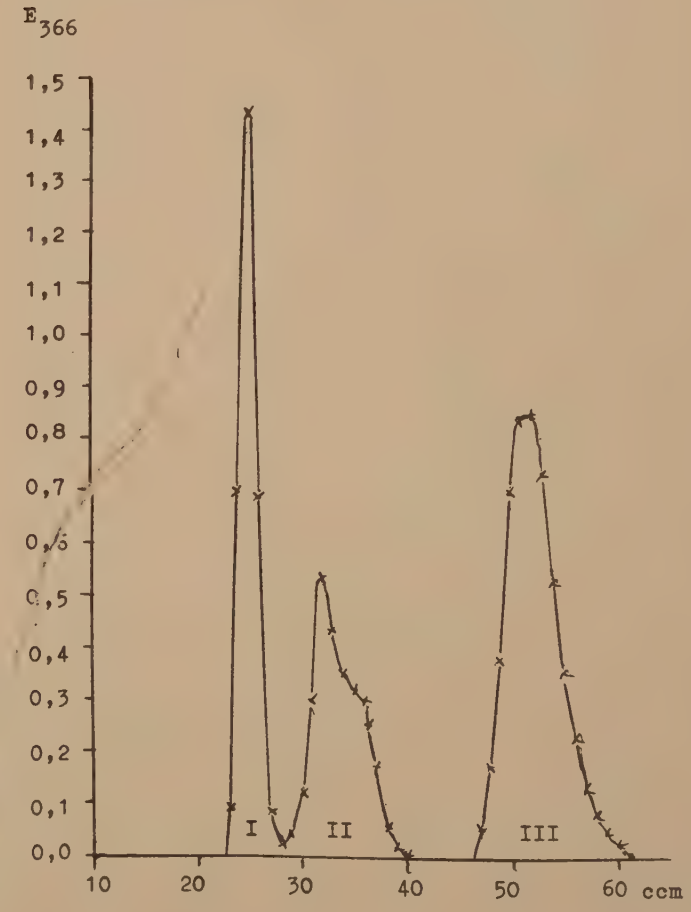
Säulenlänge 40 cm, Ø 9 mm; Lsgm.: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol wie 5:10:30:20

Aufgetrg. Menge: I = 0,32 mg, II = 0,56 mg, III = 0,35 mg und IV = 0,66 mg.

Abb. 31 Quantitative Trennung von DNP-Leu-diglycin (I), DNP-Gly-Phe-Glu (II) und Di-DNP-Leu-Gly-Lys (III).

Säulenlänge 30 cm, Ø 9 mm; Lsgm.: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5:10:30:20.

Aufgetragene Menge: I = 0,37 mg, II = 0,52 mg, III = 0,59 mg



b) Versuche an Derivaten des 2.4-Dinitroanilins, an Polynitroverbindungen und 2.4-Dinitrophenylhydrazonen.

Im Zusammenhang der Untersuchungen über die Art der Bindung des DNP-Restes an Polycaprolactam war es interessant zu wissen, wie sich Derivate des 2.4-Dinitroanilins und ähnliche Verbindungen mit 2 aromatischen Nitrogruppen chromatographisch verhalten würden.

Tabelle 12 gibt die R_f-Werte und Abb. 32 (s. S. 59) die dazugehörigen Bandenbreiten wieder:

Tabelle 12

R_f-Werte von einer Reihe von Mono- und Di-Nitroderivaten. Säulenlänge 25 cm, Ø 9 mm; Lösungsmittel: DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol, wie 5 : 10 : 30 : 20.

Nitroderivate	R_f-Wert
m-Nitro-dimethylanilin	0,80
p-Nitro-dimethylanilin	0,80
2.4-Dinitro-anilin	0,43
2.4-Dinitro-N-methylanilin	0,92
2.4-Dinitro-N-dimethylanilin	0,63
2.4-Dinitro-acetanilid	0,71
2.4-Dinitro-methylmercaptan	0,92
1.2-Dinitro-benzol	0,92
1.3-Dinitro-benzol	0,60

Man sieht, daß die in Tabelle 12 untersuchten Nitroverbindungen durchwegs mit hohen R_f-Werten wandern und sich in diesen nicht sehr unterscheiden. Lediglich 1.2-Dinitrobenzol und 1.3-Dinitrobenzol zeigen schmale Eluatbanden und eine genügend grosse R_f-Wert-Differenz, so daß sie gut voneinander getrennt werden können. Möglicherweise dürften auch eine Trennung von 2.4-Dinitro-N-methylanilin und 2.4-Dinitro-N-dimethylanilin bei

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Größe der erhaltenen R_f-Werte in dem oben beschriebenen Lösungsmittelgemisch.

Tabelle 13

R_f-Werte von Polynitroverbindungen, gemessen an Ultramid BM. Säulenlänge 27 cm, Ø 9 mm; Lösungsmittelgemisch s. S. 60

Nitroverbindung	R_f-Wert
3.5-Dinitrosalicylsäure	0,56
Pikrinsäure	0,55
Martiusgelb	0,48
Styphninsäure	0,46
Pikrolonsäure	0,39
1.3.5-Trinitrobenzol	0,39
Flaviansäure	0,21
Amidoschwarz 10 B	0,00

Wie man aus Abb. 33 (s. S. 62) ersieht, zeichnet sich 3.5-Dinitrosalicylsäure durch eine relativ breite Eluatbande aus. Es wurde ferner gefunden, daß Pikrinsäure von 2.4-Dinitrosalicylsäure nicht getrennt werden kann, obwohl die R_f-Wert-Differenz genügend groß ist, ein Zeichen für die Ausbildung von Affinitätskräften zur Pikrinsäure. Dagegen verlief die Trennung von Pikrinsäure und Flaviansäure einwandfrei (s. S. 63, Abb. 34). N-Dimethyl-2.4-dinitroanilin läuft mit der Lösungsmittelfront, stört aber die Trennung von Pikrin- und Flaviansäure nicht. Wir glauben mit dem oben beschriebenen Lösungsmittelgemisch eine gute Trennmöglichkeit für hochnitrierte aromatische Systeme gefunden zu haben. Vielleicht hat die Reinigung solcher Systeme an Ultramid BM ein besonderes Interesse.

Abb. 33

Zonenbreiten einer Reihe von Polynitroverbindungen an Ultramid BM.

Säulenlänge 27 cm, Ø 9 mm; Lösungsmittel: Polyäthylenglykoläthyläther, DMFA, Formamid, Eisessig, Ameisensäure, Wasser, Alkohol wie 40:30:20:50:15:35:50

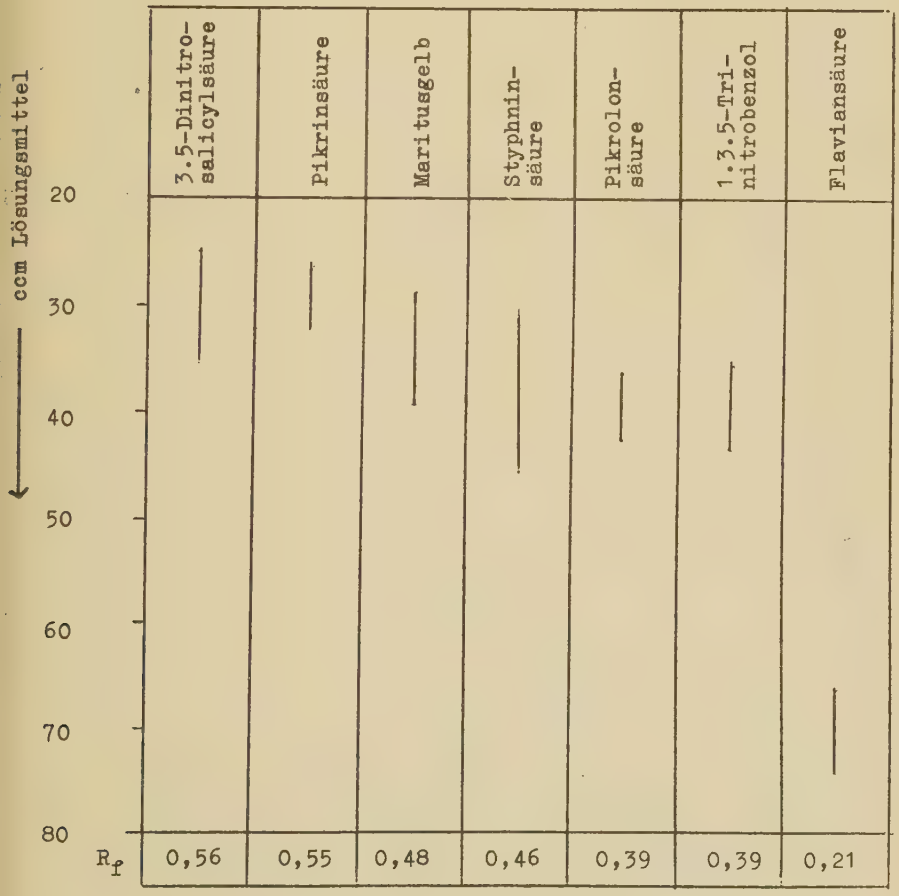
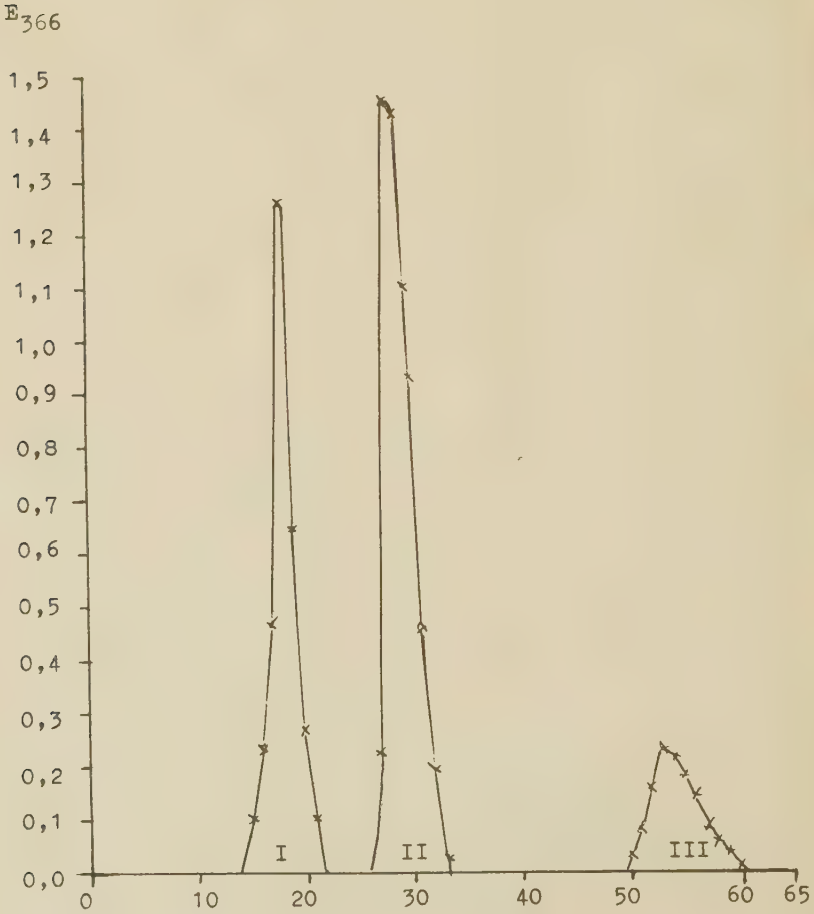


Abb. 34

Trennung von N-Dimethyl-2.4-Dinitroanilin (I), Pikrinsäure (II) und Flaviansäure (III) an Ultramid BM.

Säulenlänge 30,5 cm, ø 9 mm; Lösungsmittel: Polyäthylenglykol, DMFA, Formamid, Eisessig, Ameisensäure, Wasser, Alkohol wie 40:30:20:50:15:35:50



2.4-Dinitrophenylhydrazone

Die Untersuchung von 2.4-Dinitrophenylhydrazonen war für uns vor allem von theoretischem Interesse, da sich hier das Elektronensystem des aromatischen Kerns auf dem Wege über die Hydrazogruppe weit mehr auf die polare Struktur des "übrigen Moleküls" auswirken kann, als bei den bisher besprochenen Verbindungen. So wurden die 2.4-Dinitrophenylhydrazone des Acetons, des Benzaldehyds und des Zimtaldehyds hergestellt und ihr säulenchromatographisches Verhalten geprüft. Dabei zeigte sich, wie zu erwarten war, daß 2.4-Dinitrophenylhydrazone sehr stark adsorbiert werden. Nach langwierigen Versuchen ist es bisher gelungen, mit folgendem Lösungsmittel eine Elution der Verbindung zu erwirken:

Polyäthylenglykol	80	Volumenteile
Methylcarbitol	30	"
Wasser	20	"
Alkohol	30	"

Die Banden treten jedoch in Form von sehr breiten Streifen auf, wobei offensichtlich ein Teil des 2.4-Dinitrophenylhydrazons auf der Säule haften bleibt.

c) Methodische Vorzüge der Chromatographie von DNP-Verbindungen an Polyamid.

Zur besseren Beurteilung der von mir entwickelten Methodik an monomerenarmen Polyamid sollen hier einerseits die von Green und Kay[20] und Schröder[27] an Kieselgel-Celite und andererseits die von Hille und Steuerle[14] unabhängig von uns an Nylon entwickelte Methodik mit der unsrigen verglichen werden (Hille und Steuerle veröffentlichten ihre Arbeit zu einem Zeitpunkt, als die vorliegende Arbeit bereits experimentell abgeschlossen war.).

1. Bei Verwendung von Kieselgel-Celite muß das Säulenmaterial vor der chromatographischen Trennung nacheinander mit den gut getrockneten Lösungsmitteln wie Äther, Aceton-Äther 1:1, Ligroin und dem Eluiergemisch ins Gleichgewicht gesetzt werden, um Spuren von Wasser restlos zu beseitigen. Bei Verwendung von Perlon fällt dieser Schritt weg. Das Perlonpulver wird mit dem vorhergesehenen Eluatgemisch drei Stunden unter Rühren behandelt. Nach Einfüllen in die Säule kann direkt chromatographiert werden.

2. Für Trennungen an Kieselgel-Celite dienen vorzugsweise Lösungsmittelgemische von sehr leicht flüchtigen Substanzen wie Äther, Aceton, Essigester, Chloroform und Ligroin. Dies hat zur Folge, daß sich häufig infolge zu starker Verdunstung des Eluates am Auslauf der Säule Substanz abscheidet, was zu Verlusten führt. Außerdem können infolge dieser leichten Verdunstung bei der Aufteilung des Säuleneluates in Einzelfraktionen diese häufig nicht direkt photometriert werden.

Die von mir benutzten Lösungsmittelgemische enthalten sämtlich Wasser, so daß man von der Sorge des Feuchtigkeitsausschlusses befreit ist. Ferner liegen die Siedepunkte der Komponenten der Eluiergemische zwischen 78° und 155°; eine Verdunstung ist daher nicht zu befürchten. Sämtliche Lösungsmittel enthalten im Gegensatz zu Steuerle und Hille keine Salze, so daß wertvolle Substanzen im Eluat durch Eindampfen im Vakuum mühelos in fester Form zu erhalten sind.

3. Wie auf Seite 34 beschrieben, ist die Zonenverbreiterung von DNP-Aminosäuren an Perlon gegenüber der an Kieselgel-Celite um durchschnittlich 35 % verringert. Man ist daher leicht in der Lage, größere Säulenlängen zu wählen und kann somit die Trennleistung erhöhen.

4. Substanzen auf Kieselgel-Celite aufgebracht, laufen sehr langsam, außerdem muß das Lösungsmittelgemisch sehr häufig gewechselt werden, so daß eine einfache Trennung von nur wenigen DNP-Aminosäuren mehrere Tage in Anspruch nimmt. Eine einfache Trennung von z. B. vier DNP-Aminosäuren (s. S. 56, Abb. 30) an Polyamid benötigt dagegen maximal 1 1/2 Tage. Der Zeitbedarf ist also erheblich geringer.

5. Sämtliche Trennungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt! Im Gegensatz zur Technik von Steuerle und Hille, die bei 60° arbeiten, werden hier empfindliche Substanzen, wie sie DNP-Aminosäuren darstellen, geschont. Außerdem verlangt unsere Methodik einen geringeren apparativen Aufwand.

2. Versuche zur Wirkungsweise der Polyamidsäule und der Elutionsmittel

a) Quantitative Bestimmung der Adsorption von DNP-Glycin an Perlonpulver in Abhängigkeit von der DNP-Glycinkonzentration.

Um zu entscheiden, ob Substanzen mit aromatischen Nitrogruppen ähnlich wie phenolische Substanzen auch im Innern des Polyamidkornes aufgenommen werden, wurde die Absorption von DNP-Glycin an steigenden Mengen Perlonpulver bei konstanter Ausgangskonzentration von DNP-Glycin in alkoholischer Lösung bestimmt.

Versuchsanordnung

Ultramid BM-Pulver wurde zunächst zur Herauslösung der niedermolekularen Anteile in eine Lösung von DMFA/Eisessig/Wasser/Alkohol 5:10:30:20 eingetragen und 12 Stunden darin belassen. Danach wurde die Lösung abgesaugt. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt, wobei jedesmal mit Alkohol scharf nachgewaschen wur-

de. Schließlich wurde das noch feuchte Ultramid-Pulver im Wasserstrahlvakuum unter leichtem Erwärmen getrocknet.

Zu 10 ml-Meßkölbchen, die steigende Mengen an Perlonpulver enthielten, das wie oben beschrieben, vorbehandelt worden war (s. Abszisse der Abb. 35, S. 68), wurden je 10 ml einer alkoholischen Glycinlösung pipettiert, die 1,208 mg DNP-Glycin enthielt. Das Gemisch wurde 24 Stunden unter gelegentlichem Umschütteln im Dunkeln aufbewahrt. Danach wurde die Extinktion der überstehenden DNP-glycinhaltigen Lösung mit dem Quarzspektrographen der Firma Carl Zeiss gemessen. Das Ergebnis zeigt Abb. 35 (s. S. 68), in der die adsorbierte Menge DNP-Glycin in Abhängigkeit von der Polyamidmenge aufgetragen ist. Aus den Punkten dieser Kurve wurde durch Umrechnung die Sorptionsisotherme ermittelt, in der die Konzentration von DNP-Glycin am Polyamid zur Konzentration in Lösung in Beziehung gesetzt ist. (s. Abb. 36, S. 69)

Wie man sieht, erreicht die Adsorptionsisotherme nach einem zunächst sehr steilen Anstieg und einem geneigten Kurvenzug einen Sättigungswert, der bei 5,6 mg DNP-Glycin pro g Perlon gelegen ist.

Dieses Verhalten weicht stark von dem phenolischer Substanzen an Perlon ab, wo die Sorptionsisotherme über einen anfänglichen linearen Verlauf stetig ansteigt und Phenol unbegrenzt aufgenommen werden kann, bis es zu einer Lösung des Polyamids in Phenol kommt Hier wird also keine Sättigungskonzentration erreicht.

Die bei der Absorptions von DNP-Glycin an Perlon erreichte Sättigungskonzentration ist verhältnismäßig gering. Sie entspricht etwa 1 Mol DNP-Glycin auf 435 Mol Peptidbindungen. Dieser Befund spricht dafür, daß DNP-Glycin nur an der Oberfläche von Polyamid adsorbiert wird und nicht, wie die Phenole, im Innern des Polymeren aufgenommen wird. Dieser Unterschied, der zunächst nur in einer Versuchsserie festgestellt ist, bedarf noch einer systematischen Untersuchung, besonders durch Variierung des Lösungsmittelsystems und der davon abhängigen Quellungsbedingungen des Polyamids. Erst dann wird entscheidbar sein, ob hier wirklich ein grundsätzlicher Unterschied im Absorptionsverhalten der beiden

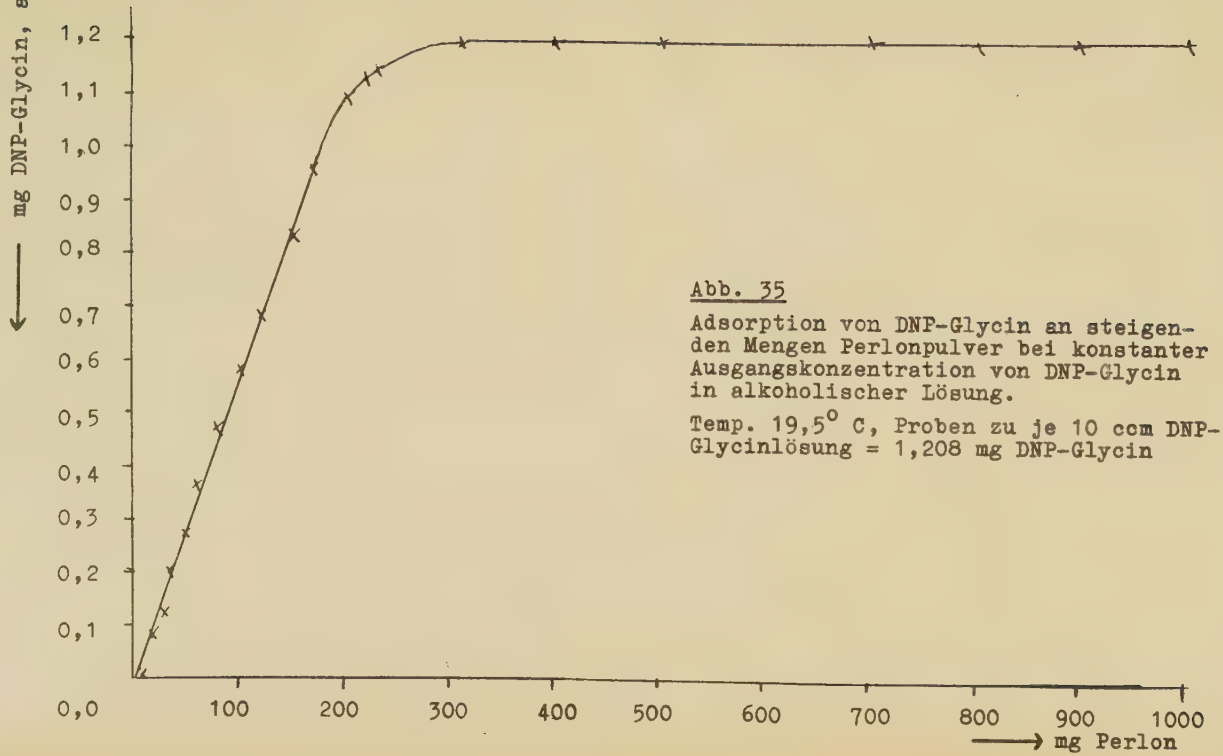


Abb. 35

Adsorption von DNP-Glycin an steigenden Mengen Perlonpulver bei konstanter Ausgangskonzentration von DNP-Glycin in alkoholischer Lösung.

Temp. 19,5° C, Proben zu je 10 ccm DNP-Glycinlösung = 1,208 mg DNP-Glycin

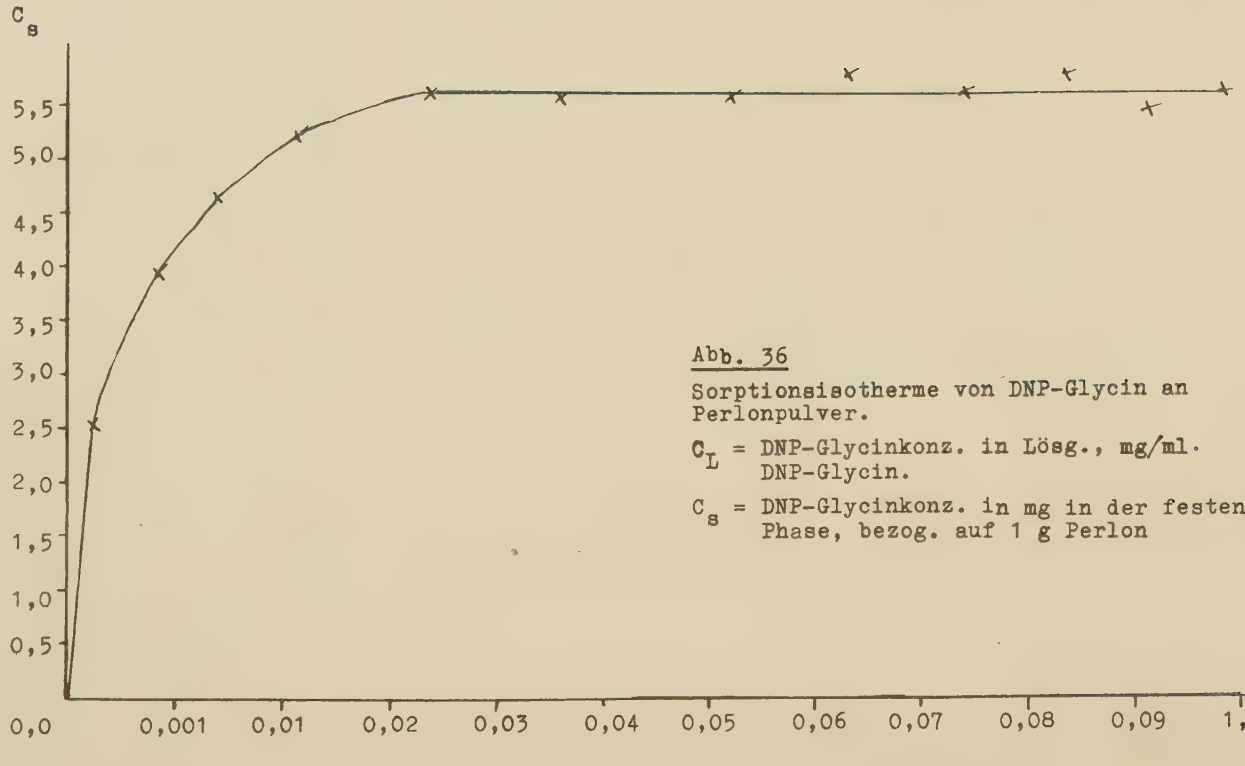


Abb. 36

Sorptionsisotherme von DNP-Glycin an Perlonpulver.

C_L = DNP-Glycinkonz. in Lösg., mg/ml. DNP-Glycin.

C_s = DNP-Glycinkonz. in mg in der festen Phase, bezog. auf 1 g Perlon

Substanzgruppen vorliegt.

b) Elutionsversuche mit reinen Lösungsmitteln

Im Laufe der chromatographischen Trennversuche an aromatischen Nitroverbindungen wurden zahlreiche, sehr komplex zusammengesetzte Lösungsmittelgemische benutzt, die in der Regel eine Säure, eine Base, einen Alkohol und Wasser in unterschiedlicher Zusammensetzung enthielten. Um einen Einblick in den Wirkungsmechanismus zu erhalten, schien es ratsam, das Elutionsvermögen der einzelnen Komponenten zu untersuchen.

Die Versuchsanordnung

Ultramid BM wurde jeweils eine halbe Stunde mit dem zur Elution vorgesehenen Lösungsmittel unter Rühren gesättigt und dann in eine 14 mm breite Säule eingefüllt, bis eine Füllhöhe von 12 cm erreicht war. Danach wurden jeweils 0,1 µMol DNP-Alanin aufgetragen und die Lage der Zonenkanten gemessen, nachdem 50 ccm des jeweiligen Lösungsmittels durch die Säule getreten waren. Das Retentionsvolumen der Säule betrug 17 ml. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Lagen der Zonenkanten in R_f-Werten angegeben. Es wurden bewußt die R_f-Werte der unteren und der oberen Zonenkanten getrennt angegeben, um auch Effekte wie Zonenverbreiterung und Schwanzbildung zu berücksichtigen.

Die Elutionsversuche ergeben keine strenge Abhängigkeit von einer einzigen Größe, sondern zeigen vielmehr, daß das Elutionsvermögen von einer ganzen Reihe von Faktoren beeinflußt wird. So steigt das Elutionsvermögen beim Vergleich homologer n-Alkohole mit wachsender Zahl der CH_2-Gruppen stark an (s. Tab. 14, S. 71).

Wie man sieht, besitzt das Methanol gegenüber dem Äthanol eine kräftigere Eluierwirkung, was wohl gegenüber dem Äthanol mit der größeren Elektronendichte am Sauerstoffatom infolge der stärkeren Protonendonatorwirkung der Methylgruppe zu erklären ist, der dann erfolgende allgemeine Anstieg des Elutionsvermögens dürfte gemäß ganz allgemeinen Erfahrungen in der Chromatographie mit steigender Affinität zum Adsorbens bei wachsender Kettenlänge zu

Tabelle 14

Zunahme des Elutionsvermögens homologer n-Alkohole mit wachsender Kettenlänge, gemessen an DNP-Alanin.

Elutionsmittel	R_f-Wert obere Bandenkante	R_f-Wert untere Bandenkante
Methanol	0,005	0,200
Äthanol	0,003	0,014
n-Propanol	0,005	0,020
n-Butanol	0,005	0,034
n-Amylalkohol	0,011	0,040
n-Hexanol	0,045	0,074
n-Heptanol	0,071	0,130
n-Oktanol	0,003	0,037

erklären sein[59]; im Falle des n-Oktanols dürfte man annehmen, daß die Affinität des Lösungsmittels zum gelösten Stoff heruntergesetzt wird (vergl. dazu S. 86).

Bei den in Tabelle 15 (s. S. 72) eingeordneten Verbindungen geht die Zunahme des Elutionsvermögens ebenfalls der wachsenden Zahl der CH_2-Gruppen im Molekül parallel. Hier dürfte jedoch die wachsende Zahl der Haftstellen des Lösungsmittels für den absorbierten Stoff für die Zunahme des Elutionsvermögens ausschlaggebender sein. So besitzt Methylcellosolve zwei ausgeprägte Haftstellen an den Elektronenpaaren der Äther-Sauerstoffatome, Methylcarbitol drei und Polyäthylenglykolmonoäthyläther eine größere Anzahl.

Die Zunahme der Haftstellen äußert sich bei Methylcarbitol hauptsächlich in einem schnelleren Wandern der Zonenfront von DNP-Alanin gegenüber Methylcellosolve als Lösungsmittel, während das Ende der Zone nicht schneller wandert. In Polyäthylenglykolmonoäthyläther wandert dagegen die gesamte Bande schneller als in Methylcellosolve. Ebenso steigt das Elutionsvermögen von Car-

bitolacetat gegenüber Methylcellosolveacetat an.

Tabelle 15

Zunahme des Elutionsvermögens mit wachsender Zahl der Haftstellen des Lösungsmittels für den gelösten Stoff, gemessen an DNP-Alanin.

Elutionsmittel	R_f-Wert obere Bandenkante	R_f-Wert untere Bandenkante
Methylcellosolve+)	0,031	0,110
Methylcarbitol+)	0,034	0,185
Polyäthylenglykol-monoäthyläther	0,100	0,143
Methylcellosolve-acetat	0,005	0,017
Carbitolacetat	0,014	0,043

Neben der Anzahl der Haftstellen ist für die Elution auch die Elektronendichte an der Haftstelle maßgebend (s. Tab. 16).

Tabelle 16

Elutionsmittel	R_f-Wert obere Bandenkante	R_f-Wert untere Bandenkante
Aceton	0,000	0,025
Essigester	0,000	0,025
N-Dimethylformamid	0,057	0,085
Natriumbikarbonat	0,150	1,000

Anstieg des Elutionsvermögens mit zunehmender Polarisation der Karbonylgruppe.

+) Zur korrekten Nomenklatur s. S. 39, unten.

So steigt in der Reihe Aceton, Essigester, N-Dimethylformamid, Natriumbicarbonat, das Elutionsvermögen mit der Zunahme der Polarisation der Karbonylgruppe stark an. Diese Zunahme der Polarisation bedeutet eine Abnahme der Doppelbindungsnatur der Karbonylgruppe und äußert sich in einer Zunahme der Wellenlängen der Infrarotbande der Karbonylgruppe[60]. So findet man die Infrarotbande bei Estern bei 1740, bei Ketonen 1725, bei Säuren 1708, bei Säureamiden 1645 und bei Carboxylatanionen bei 1560 cm^{-1}

In Tabelle 17 sind eine Reihe von Lösungsmitteln zusammengefaßt, die entweder gar keine Elutionswirkung zeigen, wie z. B. Benzol, oder sehr stark eluieren, wie Formamid, Essigsäure; Kollidin und Pyridin nehmen eine Mittelstellung ein.

Eine Messung des R_f-Wertes von DNP-Alanin mit Ameisensäure war nicht möglich, weil das Polyamid sich vollkommen darin auflöst, im Fall des Glykolchlorhydrins jedoch eine zu starke Quellung erfährt.

Tabelle 17

R_f-Werte von DNP-Alanin in anderen Lösungsmitteln, die in den bisherigen Tabellen nicht erscheinen.

Elutionsmittel	R_f-Wert obere Bandenkante	R_f-Wert untere Bandenkante
Benzol	0,000	0,000
Formamid	0,880	0,940
Essigsäure	0,750	0,810
Kollidin	0,003	0,085
Pyridin	0,034	0,160

E. Diskussion der Ergebnisse

1. Über die Art der Bindung von aromatischen Nitrogruppen an Polyamid: Wasserstoffbrückenbildung und Dipolbindung.

Während die zwischen Amidbindungen und phenolischen Hydroxylgruppen bestehenden starken Nebenvalenzkräfte ihrer Natur nach als Wasserstoffbrückenbindungen[61] aufgeklärt werden konnten, ist über die Wechselwirkung zwischen aromatischen Nitrogruppen und Amidbindungen bis auf eine Veröffentlichung von Otto[62] nichts bekannt. Otto kam auf Grund seiner Untersuchungen über die Wechselwirkung der Hautsubstanz mit Phenol, p-Nitrophenol, 2.4-Dinitrophenol und Pikrinsäure zu dem Schluß, daß zumindest bei der Pikrinsäure die Gerbwirkung auf keinen Fall auf einer Fähigkeit ihrer phenolischen Hydroxylgruppe zu Wasserstoffbrükkenbildung beruhen kann, da hier das Wasserstoffatom ionisiert ist. Infolge des großen hier vorliegenden Versuchsmaterials kann diese Vorstellung nun näher präzisiert werden, wobei ich glaube, daß Hautpulver der Polyamidfaser im Prinzip gleichgesetzt werden kann - liegen doch hier wie dort der Mehrzahl der vorhandenen polaren Haftstellen Peptidbindungen zugrunde.

Um Aussagen über die Natur der Bindungen aromatischer Nitrogruppen an Polyamid machen zu können, seien die R_f-Werte ein- und mehrfach substituierter Phenole mit denen entsprechender Nitroverbindungen verglichen. Von den Phenolen weiß man ziemlich sicher, daß sie durch Wasserstoffbindungen an Polyamid gebunden werden.

In Tabelle 18 (s. S. 75) werden die R_f-Werte von Phenolen mit denen der entsprechenden Nitroverbindungen verglichen. Nitrobenzol wandert in reinem Methanol mit der Lösungsmittelfront, während Phenol in Methanol/Wasser 1:1 mit einem R_f-Wert von 0,66 stärker zurückgehalten wird. Überraschend ist die starke Zunahme der Haftfestigkeit beim Übergang zum 1.2-Dinitrobenzol und 1.3-Dinitrobenzol und dann weiter zum 1.3.5-Trinitrobenzol. Die entsprechenden Phenole wandern verhältnismäßig schnell.

Tabelle 18

Gegenüberstellung der Haftfestigkeit von Phenolen und aromatischen Nitroverbindungen an Ultramid BM.

Phenole	R_f-Wert in Methanol/H_2O 1:1	Nitroverbindungen	R_f-Wert		
			in Methanol	in 3)	in 4)
Phenol	0,66 1)	Nitrobenzol	1,0 2)	1,00	-
Brenzcatechin	0,62 1)	1.2-Dinitrobenzol	0,01	0,92	-
Resorcin	0,62 1)	1.3-Dinitrobenzol	0,01	0,60	-
Pyrogallol	0,66 1)	-	-	-	-
		1.3.5-Trinitrobenzol	0,0	0,01	0,35

1) nach Graßmann, Hörmann und Hartl[2)]

2) nach M. Oppelt[5), 11)]

3) DMFA/Eisessig/Wasser/Alkohol 5:10:30:20

4) Polyäthylenglykolmonoäthyläther/DMFA/Formamid/Eisessig/HCOOH/Wasser/Alkohol wie 40:20:20:50:15:35:50

Die bei Phenolen mit gutem Erfolg angewandten schwach wasserstoffbrückensprengenden Lösungsmittel[2),3),5),10),11)], wie Wasser oder Gemische von Wasser mit Alkohol und Aceton bewirken bei den Dinitroverbindungen keine Elution, sondern erst die von mir gefundenen, sehr viel stärker eluierenden Gemische 3) und 4) (s. Tabelle 18, S. 75).

Diese eklatant hohe Haftfestigkeit von aromatischen Nitroverbindungen mit 2 und mehr Nitrogruppen wurde bei allen untersuchten 2.4-Dinitroverbindungen beobachtet und ist gegenüber den entsprechenden Phenolen mit einer günstigeren räumlichen Lage zur Peptidbindung der Polyamidkette nicht zu erklären (s. Ausführungen unter E. 2., S. 80).

Als Haftkräfte für Nitroverbindungen an Polyamid kommen wasserstoffbrückenbindungen und elektronische Wechselwirkungen in Frage. Für Wasserstoffbrückenbindungen wäre in diesem Falle - anders als bei der Bindung von Phenolen an Polyamid - zu fordern, daß die NH-Gruppen der Amidbindungen des Polyamids Wasserstoffdonatoren und die Nitrogruppen Acceptoren darstellen. Neben diesen Bindungen ist aber auch an eine elektronische Wechselwirkung zwischen den Karbonylgruppen des Polyamids und den Nitrogruppen zu denken. Für diese dürften die sehr stark elektronegativen Nitrogruppen die Elektronenacceptoren darstellen. Schließlich ist noch an eine Dipolanziehung zu denken. Das Dipolmoment einer Peptidgruppe beträgt 4,54 Debye[63)], dasjenige der Nitrogruppe 4,24 Debye[64)].

Wie weiterhin aus den nachfolgenden Untersuchungen an Raummodellen über die räumliche Lage der DNP-Verbindungen hervorgeht, können 1.2- wie auch 1.3-Dinitrobenzol nur je eine Wasserstoffbrückenbindung mit einer NH-Gruppe einer Peptidbindung eingehen, während die zweite Nitrogruppe in die Nähe einer Carbonylgruppe zu liegen kommt und daher keine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden kann. Wasserstoffbrückenbindungen können daher allein nicht für die hohe Haftfestigkeit von Dinitrobenzolderivaten verantwortlich gemacht werden, sondern es müssen noch zusätzlich andere zwischenmolekulare Kräfte wirksam sein. Meiner Meinung

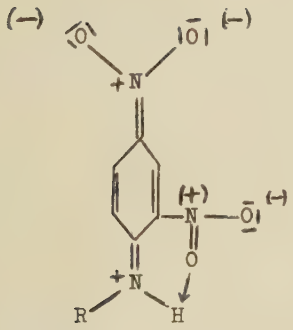
nach kommen dafür Dipolkräfte in Frage.

Die mittleren Reichweiten liegen für den Dipol-Dipol-Richteffekt bei etwa 5 Å [65], also etwa in der gleichen Größenordnung wie die des Wasserstoffbrückenbindungseffektes. Die Bindungsenergien der Wasserstoffbrückenbindung sind in der Regel 3 - 6 Kcal/Mol größer als die der zwischenmolekularen Kräfte.

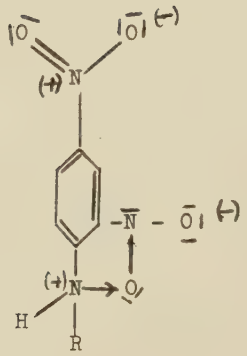
Nitrobenzol ist nämlich schon sehr leicht mit Methanol aus dem Polyamid eluierbar, da es zu diesem nur eine Bindung - entweder Wasserstoffbindung oder Dipolbindung- ausbilden kann. Eine am Benzolkern vorhandene zweite Nitrogruppe erhöht nicht nur das Haftvermögen, indem sie eine zweite Haftstelle ausbildet, sondern verursacht auch ein erhöhtes Wechselspiel mit den Elektronen des Benzolkerns und bedingt damit eine Vielzahl neuer Mesomeriemöglichkeiten. Die Folge ist eine Verstärkung der Dipolstruktur der einzelnen Nitrogruppen, damit verbunden eine erhöhte Wechselwirkung mit den Elektronen der Peptidgruppe des Polyamids, die eine erhöhte Haftung verursacht..

Spektren von DNP-Verbindungen weisen in polaren Lösungsmitteln im allgemeinen zwei Banden im Bereich von 240 - 260 mμ und 330 - 370 mμ auf. Diese Strukturen können nach Hörmann und Endres[66] und Frank und Mitarb.[67] folgendermaßen interpretiert werden:

Die chinoide Grenzstruktur I gibt Anlaß zum Auftreten eines Absorptionsmaximums im Bereich von λ_3 (310 - 360 mμ). Die zweite Bande bei etwa 240 - 260 mμ (λ_1) wird durch die Wasserstoffbindung zwischen o-Nitro-Gruppe und Aminogruppe hervorgerufen. Außerdem diskutieren die Autoren noch eine zweite polare Struktur II, in der die Methylaminogruppe aus der Benzolebene gedreht ist. Die Wechselwirkung des freien Elektronenpaares der Aminogruppe mit der o-Nitrogruppe soll ebenfalls zu einer Absorption im Bereich von λ_3 Anlaß geben.



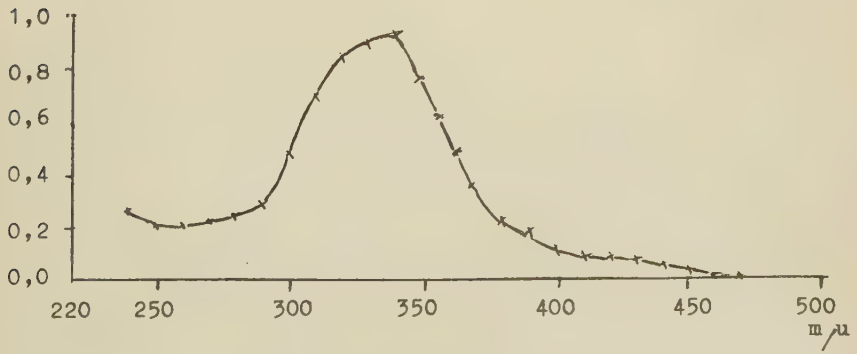
I



II

Das Spektrum von DNP-Verbindungen an Polyamid kann nicht ohne weiteres bestimmt werden. Ich wählte daher N-Methyl-acetamid an Stelle von Polyamid als Modellsubstanz.

Abb. 37
UV-Spektrum von DNP-Alanin in N-Methylacetamid.

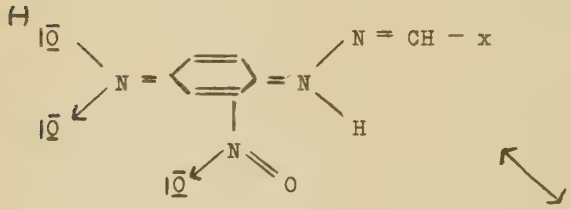


Die Aufnahme des UV-Spektrums von in Methylacetamid gelöstem DNP-Alanin ergab eine breite Absorption im Bereich von 340 mμ (λ_3) und eine recht schwache im Bereich von 240 mμ (λ_1) (S. Abb. 37, S. 78).

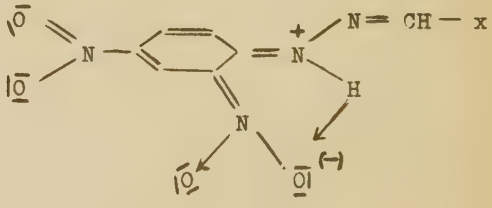
Das Maximum bei 340 mμ spricht für eine deutliche Ausbildung der polaren Struktur I, während die intermolekulare Wasserstoffbindung nur schwach ausgeprägt zu sein scheint, wie man aus der schwachen Extinktion bei 240 mμ ersieht.

Das Auftreten polarer Strukturen bei der Adsorption der gelben DNP-Verbindungen an Ultramid BM ist sehr gut beim Aufbringen der Substanzen zu beobachten. Stets nimmt die Farbintensität zu. Bei Verwendung des nur sehr schwach gelben 2.4-Dinitrophenols ist dieser Effekt am stärksten ausgeprägt.

Auch 2.4-Dinitrophenylhydrazone sind, wie Bohlmann[68] gezeigt hat, in der Lage, mehrere polare, mesomere Strukturen auszubilden, was mit dem von mir festgestellten Haftvermögen übereinstimmt[a) und b)].



a)



b)

2. Über mögliche räumliche Lagen der DNP-Verbindungen an Polyamiden und deren Beziehung zur Eluierbarkeit.

Um über den Haftmechanismus von DNP-Verbindungen an Polycaprolactam Aussagen machen zu können, ist es notwendig, seine Struktur vorher eindeutig festzulegen. Die ersten Untersuchungen über die Struktur von Perlon L (Polyamid aus ε-Aminocapronsäure) stammen von Brill[69]. Er gibt eine monokline Elementarzelle mit antiparalleler Anordnung der Elementarketten mit vier Grundeinheiten an: a = 9,66 Å, b = 8,32 Å, c = 17,2 Å und γ = 65°. Für Präparate, die unter sehr langsamem Abkühlen hergestellt wurden und daher besonders gut kristallisiert sind, fand Wallner[70] ebenfalls eine monokline Zelle mit etwas gegenüber Brill veränderten Werten: a = 9,45 Å, b = 8,02 Å, c = 17,08 Å; γ = 68°. Der Abstand der einzelnen Polyamidketten in a-Richtung beträgt in beiden Modellen 4,83 Å, bzw. 4,72 Å und in b-Richtung 4,16 Å, bzw. 4,01 Å. Günther[71] erhielt bei seinen Untersuchungen eine trikline Zelle, die jedoch nicht wieder bestätigt wurde[72]. Alle diese Arbeiten lassen eine volle Ausbildung sämtlicher Wasserstoffbrückenbindungen zu, bei antiparalleler Anordnung der Polycaprolactamketten innerhalb der Rostebene, berücksichtigen jedoch nicht die dadurch entstehende ungleichsinnige Anordnung der Dipolmomente der Peptidgruppen, was nach Huisgen und Walz[73] eine sehr energiereiche Form bedeuten würde.

Nach einer kürzlich von Kinoshita[74] erschienenen Arbeit wird die antiparallele Struktur hauptsächlich von Polyamiden mit gerader Anzahl von CH_2-Gruppen gebildet. Bei ungerader Zahl von CH_2-Gruppen, wie sie auch beim Polycaprolactam vorliegt, liegt dagegen eine besondere neue energiearme monokline γ-Struktur mit paralleler Anordnung der Ketten vor. Hierbei kommt es durch die Neigung der Amidebene von annähernd 30° gegen die Faserachse zur vollen Ausbildung aller Wasserstoffbindungen in Übereinstimmung mit dem von Pauling und Corey[75] ausgesprochenen Postulat für die Struktur von Polypeptiden. Die Wasser-

stoffbrückenbindungen weisen dabei eine kleine Abweichung von der normalen NH-Bindungsrichtung auf, wie sie auch von Pauling bei Wasserstoffbrückenbindungen zugelassen wird. Den nachfolgenden Abbildungen von Kalottenmodellen liegt gemäß Kinoshita eine parallele Anordnung der Peptidketten zugrunde. Wie man aus Abb. 38 sieht, äußert sich die Deformierung der Wasserstoffbindungen im Modell in einem Winkel am H-Brückenatom.

Abb. 38

Kalottenmodell von zwei gestreckten Polyamidketten in paralleler Anordnung.

Der Abstand zweier Polyamidketten beträgt in der monoklinen γ-Struktur nach Kinoshita 4,82 Å; der Abstand zwischen der NH-Gruppe und dem O-Atom der Wasserstoffbrückenbindung beträgt jedoch nur 2,77 Å. Da für eine aromatische Nitroverbindung z. B. einen DNP-Rest, im wesentlichen nur die Peptidbindungen der Polyamidketten als Haftstelle in Frage kommen, diese aber schon durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zur Peptidbindung der Nachbarkette in Anspruch genommen ist, muß zunächst die Wasserstoffbrücke gesprengt werden, wenn es zur Haftung kommen soll. Darüberhinaus ist aber auch eine starke Weitung der Abstände zwischen den einzelnen Polyamidketten erforderlich, wenn das große DNP-Molekül (äußerer Abstand der Nitrogruppen etwa 8 Å) festgehalten werden soll.

Durch Vorbehandlung des Polyamidkornes mit Lösungsmitteln kann eine Aufweitung des Gitters durch Quellung herbeigeführt werden. Um das Eindringen des großen DNP-Restes zwischen zwei Polyamidketten zu ermöglichen, dürfte mindestens eine 80 %ige Aufweitung notwendig sein.

Als quellend wirkende Agentien kommen in den von mir verwendeten Lösungsmitteln vor allem Essigsäure, Ameisensäure, Dimethylformamid und Wasser in Betracht. Nach einer Aufstellung von Hopff[76], der die Quellung von Polyamiden in einer Reihe von Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen untersucht hatte, quillt Polycaprolactam in 10 %igen Lösungen von Ameisensäure und Essigsäure etwa bis zu 20 %.

Über die Quellung mit Wasser unterrichtet eine Firmenschrift der BASF. Die Wasseraufnahme von spritzgegossenen 1 mm starken Rundscheiben erreicht bei einer Lagerzeit von 48 Stunden ein Maximum von etwa 12,5 % und ändert sich beim weiteren Lagern nicht mehr merklich. Die Wasseraufnahme ist weiterhin stark abhängig von der Stärke der untersuchten Prüfkörner. Das in dieser Arbeit benutzte Ultramid BM-Pulver besitzt eine Siebgröße von 0,2 mm, also einen 5fach geringeren Durchmesser und damit auch eine 5fach kürzere Quellungszeit als die untersuchten Prüfkörner. Berücksichtigt man noch die durch Protonendonatoren, wie Essigsäure oder Ameisensäure geförderte raschere Quellung, so kann man sagen, daß eine Quellungszeit von 3 Stunden bei intensivem Durchmischen durchaus genügt, um das Maximum der Wasseraufnahme zu erreichen. Tatsächlich wurde auch ein verändertes chromatographisches Verhalten bei Ausdehnung der Quellungszeit bis zu 24 Stunden nicht beobachtet.

Die angeführten Betrachtungen machen es wahrscheinlich, daß die Quellung in den in meinen Versuchen benutzten Lösungsmitteln nicht über 20 % hinausgeht. Man sollte sich daher bei den nachfolgenden Betrachtungen an Kalottenmodellen vor Augen halten, daß wahrscheinlich nur die Oberflächen oder die nicht kristallin geordneten Bereiche des Ultramids BM dem DNP-Rest genügend Platz bieten und daher für eine Adsorption besser in Frage kommen.

Unter diesen Voraussetzungen hat DNP-Glycin, wie man am Modell

sieht (s. Abb. 39) grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten, mit den polaren Peptidgruppen des Polyamids in Wechselwirkung zu treten. Einmal können die Nitrogruppen des DNP-Restes an einer Carbonylgruppe und einer NH-Gruppe der gleichen Polyamidkette fixiert werden, während die Carbonylgruppe des Carboxyls mit einem NH-Rest der Nachbarkette eine Wasserstoffbrükkenbindung eingeht. (Abb. 39)

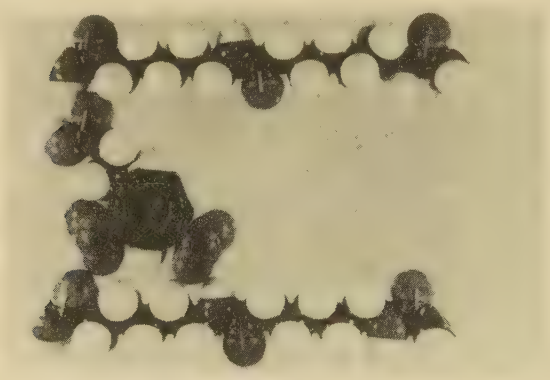


Abb. 39

Fixierung von DNP-Glycin an Ultramid BM. Einstellmöglichkeit I: Beide Nitrogruppen des DNP-Restes haften an der gleichen Polycaprolactamkette.

Aber auch die Fixierung beider Nitrogruppen an je einer Peptidbindung beider Ketten ist ohne weiteres möglich, während die Carboxylgruppe des Carboxyls wiederum mit der NH-Gruppe einer dritten Peptidbindung verknüpft ist. (Abb. 40)

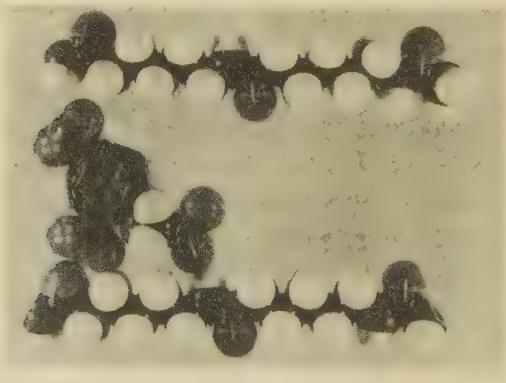


Abb. 40

Fixierung von DNP-Glycin an Ultramid BM. Einstellmöglichkeit II: Jede Nitrogruppe des DNP-Restes haftet an einer anderen Polycaprolactamkette.

Die Homologen des DNP-Glycins, also DNP-Alanin, DNP-Valin, DNP-Leucin und DNP-Isoleucin, wandern mit höheren R_f-Werten (s. S. 28, Tab. 5), obwohl auch sie sämtliche polaren Zentren mit der Polyamidfaser voll zur Auswirkung bringen können. Ihre gegenüber DNP-Glycin geringere Haftfestigkeit kann mit einer erhöhten Affinität der aliphatischen Alkylgruppen zum Lösungsmittel erklärt werden.

In Übereinstimmung mit einer häufig gemachten Beobachtung, wonach Verbindungen mit einem oder mehreren Benzolkernen gegenüber kernlosen Verbindungen von Ultramid BM stärker zurückgehalten werden, wird DNP-Phenylalanin wesentlich stärker zurückgehalten als DNP-Alanin. Nach Arbeiten von Briegleb[77] und Dewar[78] steht dies mit der Möglichkeit des stark polarisierbaren π-Elektronensystems des Benzolkerns, mit einem Protonendonator zwischenmolekulare Kräfte auszubilden, im Einklang.

Die für DNP-Glycin vorgeschlagenen Möglichkeiten der Adsorption erklären auch gut die Tatsache, daß sich m- und p-Verbindungen in ihren Absorptionsverhalten gar nicht oder nur sehr wenig voneinander unterscheiden. So wandern m- und p-Nitro-dimethylanilin in N-Dimethylformamid, Eisessig, Wasser und Alkohol (5:10:30:20; s. Tab. 12, S. 58) mit dem gleichen R_f-Wert von 0,8, m-Nitroanilin und p-Nitroanilin[5] in Methanol/Wasser 1:1 mit den R_f-Werten 0,51/0,48 und in Aceton/Wasser mit den R_f-Werten 0,68/0,61 und schließlich Resorcin[2] und Hydrochinon[5] in Methanol/Wasser 1:1 mit den R_f-Werten 0,62/0,64. Offenbar sind die innermolekularen Abstände der Haftstellen bei m- und p-disubstituierten Aromaten annähernd gleich, so daß bei vorgegebenem Abstand der Peptidgruppen in jedem Falle beide Haftstellen wirken können. Ortho-Verbindungen können dagegen nur mit maximal einer Haftstelle in Wechselwirkung treten, was sich in einer leichteren Eluierbarkeit gegenüber m- und p-disubstituierten Verbindungen bemerkbar machen müßte. Dies ist auch tatsächlich der Fall: So liegen die R_f-Werte von 1.2-Dinitrobenzol und 1.3-Dinitrobenzol in einem Lösungsmittelgemisch, bestehend aus DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol (5:10:30:20)bei 0,92, bzw. 0,60;(s. Tab. 12, S. 58), vom Substanzpaar o-Nitrophenol und p-Nitrophenol in

Methanol/Wasser 1:1 bei 0,5[2]/0,13[2], von o-Nitrobenzoesäure/p-Nitrobenzoesäure im gleichen Lösungsmittel bei 0,27/ $\leq$ 0,1[5] und von o-Hydroxybenzoesäure/p-Hydroxybenzoesäure in Methanol/Wasser 1:1 bei 0,60/0,34[5].

Wie zu erwarten, steigt die Haftfestigkeit beim Übergang von Mono- zu Di-DNP-Verbindungen (s. Tab. 6, S. 27) stark an. Di-DNP-Tyrosin bildet jedoch eine Ausnahme; es wandert in allen hier verwendeten DMFA-Eisessig-Wasser-Alkohol-Gemischen stets mit der Lösungsmittelfront. Ich erkläre dieses Verhalten damit, daß das Molekül des Di-DNP-Tyrosins keine ebene Lage einnehmen kann, da die Fläche des O-DNP-Restes gegenüber dem Tyrosinbenzolkern gewinkelt sein muß.

3. Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der benutzten Lösungsmittel.

Für die Elutionswirkung eines Lösungsmittels ist sowohl seine Affinität zu dem zu eluierenden Stoff, als auch zum Adsorbens von Bedeutung. Eine Zunahme der Affinität hat in beiden Fällen eine stärkere Elutionswirkung zur Folge; im ersten Fall, indem das Lösungsmittel den adsorbierten Stoff fester bindet als das Adsorbens, im zweiten Fall, indem es mit dem Stoff um die Adsorbtionszentren konkurriert und ihn verdrängt.

Als Affinitätskräfte zwischen Lösungsmitteln und Nitroverbindungen kommen in erster Linie elektronische Wechselwirkungen (Elektronen-donator- und -acceptoreigenschaften des Lösungsmittels) und nach Untersuchungen von Oehme[79] Dipolkräfte in Frage. Einerseits können sich Protonen von den Molekülen des Lösungsmittels an die negativ geladenen Sauerstoffatome der Nitrogruppen anlagern, andererseits können aber auch freie Elektronenpaare des Lösungsmittels zur Absättigung des Elektronenmangels der Nitroverbindungen herangezogen werden.

Dieselben Überlegungen gelten offenbar auch bei der Untersuchung der Kräfte, mit denen die Nitroverbindung an Polyamid

haftet. Die Lösungsmittelmoleküle treten also affinitätsmäßig in Konkurrenz mit den Haftstellen des Polycaprolactams, indem sie an den gleichen polaren Strukturen der betreffenden Nitroverbindung angreifen, mit denen letztere auch am Polycaprolactam fixiert ist.

Eine Wechselwirkung zwischen Lösungsmittel und Nitroverbindung beeinflußt im allgemeinen das mesomere Elektronensystem der aromatischen Nitroverbindungen, was sich in einer Veränderung des UV-Absorptionsspektrums auswirkt.

Wie schon erwähnt, weisen nach Untersuchungen von Hörmann und Endres[66] die Spektren von DNP-Verbindungen in polaren Lösungsmitteln im allgemeinen zwei Banden im Bereich von 240 - 260 mμ und 330 - 370 mμ auf. Die kurzwelligere Bande von beiden tritt nur dann auf, wenn Protonen mit der Nitroverbindung in Wechselwirkung treten, wobei dieselben allerdings auch von der Carboxylgruppe der DNP-Aminosäuren stammen können. Bei einer Wechselwirkung mit Elektronenpaaren tritt dagegen das langwelligere Maximum bei 340 - 380 mμ auf. Die quantitativen Beziehungen sind allerdings noch undurchsichtig.

Diese Vorstellungen werden eindrucksvoll durch Beobachtungen von Isherwood und Cruickshank[80] ergänzt, die Spektren von DNP-Aminosäuren in 98 %iger Schwefelsäure, einem starken Protonendonator, aufnahmen und dabei eine sehr starke Intensivierung der Bande bei 250 mμ wahrnahmen, während die bei 360 mμ allgemein gefundene nahezu verschwand.

Eine Untersuchung der Spektren von DNP-Verbindungen in verschiedenen Lösungsmitteln gestattet es also zumindest, qualitativ anzugeben, ob das Lösungsmittel mehr als Protonendonator oder als Elektronendonator wirkt.

Zur Untersuchung der Lösungsmitteleigenschaften habe ich daher die UV-Spektren von DNP-Alanin in verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen (s. S. 15). In den meisten Lösungsmitteln fand ich die beiden oben erwähnten Maxima, ein Zeichen dafür, daß das Lösungsmittel sowohl als Protonendonator als auch als Elektronendonator wirkt. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß

auch die Carboxylgruppe von DNP-Alanin als Protonendonator wirken kann, was man bei protonenfreien Lösungsmitteln in Betracht ziehen muß. Abweichende Spektren findet man im apolaren Benzol und eigenartigerweise in Ameisensäure. In beiden bildet sich ein Hauptgipfel bei etwa 290 mμ aus.

Besonders hohe Maxima im Bereich von 230 mμ weist DNP-Alanin in Methanol, tert.-Butanol und Glykolchlorhydrin auf. Gleichzeitig ist das in anderen Lösungsmitteln meist stark ausgeprägte Maximum im Gebiet von 340 - 380 mμ verhältnismäßig schwach und im Falle von Methanol sogar bis nach 330 mμ verlagert. Offenbar treten diese Lösungsmittel zur Hauptsache mit ihren Protonen mit der Nitroverbindung in Wechselwirkung, wogegen sie schlechte Elektronendonatoren darstellen dürften. Alle drei Verbindungen sind starke Elutionsmittel.

In einigen Lösungsmitteln, besonders bei den höheren Alkoholen spaltet das kurzwellige Maximum von DNP-Alanin in zwei Banden bei 230 und 260 - 270 mμ auf. Man kann dabei eine richtige Gesetzmäßigkeit erkennen, dergestalt, daß mit steigender Kettenlänge bis zum Heptanol das Maximum bei 260 - 70 mμ an Intensität gewinnt auf Kosten des Maximums bei 230 mμ. In Methanol und Äthanol findet man nur einen Gipfel bei 230 mμ, in Propanol macht sich daneben noch eine Schulter bei etwa 265 mμ bemerkbar. Diese wird in n-Butanol deutlicher, wobei gleichzeitig das erste Maximum (hier bei 240 mμ) erheblich an Intensität verliert. In n-Amylalkohol ist bereits ein deutliches Maximum bei 270 mμ ausgeprägt, bei 240 mμ findet man nur mehr eine Schulter. Letztere verschwindet ganz in Hexanol, nimmt aber in Heptanol wieder ein wenig zu. In Oktanol bildet sich wieder ein deutliches Maximum bei 230 mμ mit einer Schulter bei 260 mμ aus, ähnlich wie bei Propanol. Das Maximum bei 330 - 360 mμ unterliegt in der Alkoholreihe nur verhältnismäßig unsystematischen Schwankungen.

Diese Veränderungen des kurzwelligen Absorptionsmaximas von DNP-Alanin in den verschiedenen Alkoholen steht ein etwa parallel gehendes Elutionsvermögen der Alkohole gegenüber. Ab-

gesehen vom ersten Glied, dem Methanol, nimmt die Elutionswirkung der Alkohole für DNP-Alanin mit steigender Kettenlänge bis zum Heptanol zu, verbunden mit einem ständigen Ansteigen der Extinktion von DNP-Alanin bei etwa 260 mμ. Beim Oktanol bricht diese Reihe ab; das Elutionsvermögen geht stark zurück und man findet in diesem Lösungsmittel wieder eine Extinktion bei 230 mμ und nur eine Schulter bei 260 mμ.

In den Spektren spiegeln sich also offenbar Affinitätsbeziehungen zwischen Lösungsmittel und gelöstem Stoff wieder, die für das Elutionsvermögen der Lösungsmittel von Bedeutung sind. Die Tatsache, daß es sich um Veränderungen am Maximum im Gebiet zwischen 230 - 270 mμ handelt, macht es auf Grund der Arbeiten von Hörmann und Endres[66] wahrscheinlich, daß es sich um verschiedene Möglichkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbindungen zwischen Lösungsmittel und DNP-Alanin handelt.

Eine ähnliche Aufspaltung der kurzwelligen Absorptionsbande von DNP-Alanin beobachtet man auch bei den Alkoholen Methylcellosolve und Methylcarbitol.

Das von mir hauptsächlich benutzte Lösungsmittel, bestehend aus DMFA, Eisessig, Wasser, Alkohol 5:10:30:20, besitzt sowohl Protonen- als auch Elektronendonatorwirkung (s. S. 18, Abb. 7); hierbei dürfte jedoch, wie aus der sehr starken Absorption bei 350 mμ hervorgeht, die Elektronendonatorwirkung überwiegen.

Es paßt gut in diese Vorstellung, daß ein Ersatz des N-Dimethylformamids durch andere Elektronendonatoren möglich ist, ohne daß sich das Elutionsvermögen des Gemisches verschlechtert, z. B. durch Polyäthylenglykolmonoäthyläther (s. S. 40 und 42), Methylcellosolve (s. S. 40), Methylcarbitol (s. S. 40 und 43) und 1.4-Butandioldiglycidäther (s. S. 43). Auch die schon auf Seite 72 (Tab. 16) in der Reihe Aceton, Essigester, N-Dimethylformamid, Natriumbikarbonat, erörterte Zunahme des Eltuionsvermögens mit zunehmender Polarisation der Karbonylgruppe spricht für eine Elektronendonatorwirkung.

Wie die Elutionsversuche mit reinen Lösungsmitteln gezeigt ha-

ben, geben diese Vorstellungen aber nur ein Bild über die Hauptfaktoren der Elutionswirkung.

Darüberhinaus müssen noch andere Faktoren, so z. B. Affinitätskräfte, wie sie von einer größeren Anzahl von CH_2-Gruppen ausgeübt werden, oder aber die Zunahme des Elutionsvermögens mit wachsender Zahl der Haftstellen des Lösungsmittels für den gelösten Stoff berücksichtigt werden.

Zusammenfassung

1. Es wurde das Verhalten von 57 Substanzen mit zwei und mehr aromatischen Nitrogruppen gegenüber Polycaprolactam (Ultramid BM der BASF) untersucht.

2. Eine neuartige Trennung von Mono- und Di-DNP-Aminosäuren an Polycaprolactam wurde ausgearbeitet.

3. Es konnte gezeigt werden, daß Polycaprolactam sich gut zur Trennung von DNP-Peptiden eignet.

4. Es wird erstmals die chromatographische Trennung von aromatischen Polynitroverbindungen, wie Trinitrobenzol, Pikrinsäure und Flaviansäure usw. an Polycaprolactam beschrieben.

5. DNP-$A_m$inoalkohole besitzen in den betrachteten Lösungsmittelsystemen eine geringe Haftfestigkeit gegenüber Polycaprolactam. Auf die Ausarbeitung einer Trennung wurde deshalb verzichtet.

6. 2.4-Dinitrophenylhydrazone werden außerordentlich stark an Polycaprolactam absorbiert. Möglichkeiten ihrer Trennung werden aufgezeigt.

7. Die große Haftfestigkeit von DNP-Verbindungen an Polycaprolactam wird außer der bekannten Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen in der Hauptsache auf die Wirkung von Dipolkräfte zurückgeführt.

8. Im Lauf der Untersuchung wurden neun verschiedene neue Lösungsmittelsysteme entwickelt, die zur Elution der oben genannten Verbindungen dienen. Ihre Wirkung wurde auf Grund umfangreicher UV-spektroskopischer Untersuchungen dehingehend gedeutet, daß zwischen Lösungsmittel und Nitroverbindung Affinitätskräfte bestehen, welche von Protonen und freien Elektronenpaaren der Lösungsmittelmoleküle ausgehen.

9. Auf Grund von Untersuchungen an Kalottenmodellen werden Vorstellungen über mögliche Lagen des DNP-Restes an und innerhalb der Polycaprolactam-Ketten entwickelt.

Literaturverzeichnis

1. V.Carelli, A.M.Liquori und A.Mele, Nature (London) 176 70 (1955)

2. W.Graßmann, H.Hörmann und A.Hartl, Makromol. Chem. XXI, 1 37 (1956)

3. W.Graßmann, H.Endres, W.Pauckner und H.Mathes, Chem.Ber. 90 1125 (1957)

   W.Graßmann, H.Endres und W.Pauckner, Ber. 91 134 (1958)

4. O.Th.Schmidt und W.Schönleben, Z.Naturforschg. 12b 262 (1957)

5. M.Oppelt, unveröffentl. Dissertation München 1959

6. H.Hörhammer, H.Wagner und W.Leeb, Naturwiss. 44 513 (1957)

   L.Hörhammer, H.Wagner und W.Graßmann, Naturwiss. 45 388 (1958)

   L.Hörhammer, H.Wagner, J.Jzquierdo und H.Endres, Arch.d. Pharmaz. 63 269 (1958)

7. R.Neu, Nature 182 660 (1958)

8. A.Butenandt, Vortrag XVII, Int.Kongreß f. reine und angew. Chemie 1959

   s.a. Helga Kübler, München, Dissertation in Vorbereitung

9. F.Leppmeier, München, Dissertation in Vorbereitung

   vergl.hierzu R.Brockhaus, Dissertation München 1959
   W.Graßmann, Leder 9 193 (1958)

10. W.Graßmann, H.Endres, M.Oppelt und H.El Sissi, Leder 10 149 (1959)

11. W.Graßmann, H.Endres und M.Oppelt, Hoppe-Seyler's Z.f.physiol. Chem., im Druck

12. G.Reich, Angew. 70 602 (1958)

    G.Reich und W.Barthel, Ges.Abh.d.Dt.Lederinst.,Freiberg (Sachsen), Heft 14, 27 (1959)

13. D.E.Hathway und J.W.T.Seakins, Biochem.J. 72 369 (1959)

14. H.Steuerle und E.Hille, Hoppe-Seyler's Z.f.physiol.Chem. 331 220 (1959)

    s.a. H.Zahn und E.Hille, Z.Naturforschg. 13b 824 (1958)

15. H.Hörmann und H.v.Portatius, Hoppe-Seyler's Z.f.physiol. Chem. 315 141 (1959)

16. F.Sanger, Biochem. J. 39 507 (1945)
R.R.Porter und F.Sanger, Biochem. J. 42 287 (1947)

17. S.Blackburn, Biochem. J. 45 579 (1949)

18. H.Davoll, R.A.Turner, J.G.Pierce, V.du Vigneaud, J.Biol. Chem. 193 363 (1951)

19. J.C.Perrone, Nature (London) 167 513 (1951)
s.a. A.Courts, Biochem. J. 58 70 (1954)

20. F.C.Green und L.M.Kay, Analyt.Chem. 24 727 (1952)

21. S.M.Patridge und T.Swain, Biochem.J. 166 272 (1950)

22. F.Sanger, Biochem. J. 44 126 (1949)

23. G.Mills, Nature (London), 165 403 (1950)
S.M.Portridge, H.F.Davis, Biochem. J. 46 532 (1950)
S.Blackburn, A.Lowther, Biochem. J. 48 126 (1951)
H.S.Rhinesmith, W.A.Schroeder, L.Pauling, J.Amer.Chem.Soc. 79 609 (1957)

24. E.Lederer und M.Lederer, Chromatography, A review of principles and application. Elsevier Publ.Comp. New York, 1957
M.Hais und K.Macek, Handbuch der Papierchromatographie, Bd. I, VEB Fischer-Verlag, Jena 1958
F.Cramer, Papierchromatographie, 4.Aufl., Verlag Chemie, Weinheim (Bergstraße) 1958
R.J.Block, E.L.Durrum und G.Zwerg, Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, Acad.Press, Inc.Publishers, New York 1958

25. F.Sanger, Biochem. J. 563 (1949)

26. T.D.Kroner, W.Tabroff und J.J.McGarr, J.Amer.Chem.Soc. 75 4084 (1953)

27. W.A.Schroeder, Amer.Chem.Soc. 74 5118 (1952)
W.A.Schroeder, L.R.Honnen, Amer.Chem.Soc. 75 4615 (1953)

W.A.Schroeder, L.R.Honnen, F.C.Green, Proc.Nat.Acad.Sci. V.S. 39 23 (1953)

W.A.Schroeder, L.M.Key, J.LeGette, L.Honnen und F.C.Green, Amer.Chem.Soc. 76 3556 (1954)

28. R.Consden, H.H.Gordon, A.J.P.Martin und L.M.Synge, Biochem. J. 41 596 (1947)

29. D.M.P.Phillips und J.M.L.Stephen, Nature 162 152 (1948)

30. C.Fromageot, M.Jutisz, D.Meyer und L.Penasse, Biochim. biophys.Acta (Amsterdam) 6 283 (1950)

31. W.Graßmann, H.Hörmann und H.Endres, Chem.Ber. 86 1477 (1953)

32. W.Graßmann, H.Hörmann und H.Endres, Hoppe-Seyler's Z.f. physiol.Chem. 296 208 (1954)

33. W.Graßmann, H.Hörmann und H.Endres, Ber. 88 102 (1955)

34. H.Jatzkewitz, N.D.Tam, Hoppe-Seyler's Z.f.physiol.Chem. 296 188 (1954)

35. W.Graßmann und A.Riedel, Hoppe-Seyler's Z.f.physiol.Chem. 312 206 (1958)

36. K.Cruse und R.Mittag, Z.anal.Chem. 131 273 (1950)

37. Halfter, Z.ges.Schiess.u.Sprengstoff, 38 173 (1943)

38. F.A.Teague, W.A.Gey und R.W.van Doleh, Anal.Chem. 27 785 (1955)

39. J.E.Larson und S.H.Harvey, Chem.and Ind., 45 (1954)

40. A.Schroeder, Ann.N.Y., Acad.Sci. 49 204 (1948)

41. J.Franc, Chem. Listy 49 872 (1955)

42. A.G.Long, J.R.Quayle und R.J.Stedmann, J.chem.Soc. 2197 (1951) (London)

43. J.Franc, Chem.Listy 51 2041 (1957)

44. H.Adkins und G.Krsek, J.Amer.Chem.Soc. 71 3051 (1949)
E.Lederer, Bull.soc.chim.biol. 25 1073 (1943)
K.Löhr, Biochem.Z. 320 115 (1950)
J.A.P.Martin, Ann.N.Y., Acad.Sci. 49 249 (1948)
Y.R.Noves und E.Perrottet, Helv.Chim.Acta 24 3 (1941)

45. J.F.Carson, J.Amer.Chem.Soc. 73 4652 (1951)
E.W.Mahubey, J.Amer.Chem.Soc. 76 980 (1954)
J.D.Roberts und C.Green, Ind.Eng.Chem.Anual.Ed. 18 335 (1954)

46. F.Sorm, M.Suchy und V.Heront, Chem.Listy 46 55 (1952)
C. A. 46 111346 (1952)

47. F.Turba und E.v.Schrader-Beielstein, Naturwiss. 34 57 (1947)

48. A.Walchab, J.Amer.Chem.Soc. 70 3580 (1948)
F.H.Stadtman und A.Kornberg, J.Biol.Chem. 203 47 (1953)

49. J.W.White, J.Anal.Chem. 20 726 (1948)
J.A.Elvidge und M.Whalley, Chem.and Ind. 589 (1955)

50. L.Horner und W.Kirmse, Ann. 597 48 (1955)

51. W.S.Lynn jr., L.A.Steele und E.Staple, Anal.Chem. 28 132 (1956)

52. G.Otto, Leder 6 207 (1955)

53. C.G.Cannon, Mikrochim.Acta, 556 (1955)

54. M.Oppelt, Dissertation, München 1958
s.a. W.Graßmann, H.Endres und M.Oppelt, Hoppe-Seyler's Z. f.physiol.Chem., im Druck

55. A.Müller, Diplomarbeit, München 1957

56. K.R.Rao und H.A.Sober, J.Amer.chem.Soc. 76 1328 (1954)

57. F.S.Scanes und B.T.Tozer, Biochem.J. 63 282 (1956)

58. W.A.Schroeder und L.R.Honnen, Amer.chem.Soc. 75 4615 (1953)

59. A.Tiselius, Endeavour XI 41 (1952)
R.T.Holman und L.Hagdahl, J.Biol.Chem. 182, 1 421 (1950)

60. L.J.Bellamy, J.Chem.Soc. (London) 4 223 (1955)

61. W.Graßmann und G.Deffner, Hoppe-Seyler's Z. 293 89 (1953)
A.Westphal, O.Lüderitz und F.Bister, Z.Naturforschg. 7b 1948 1952
F.M.Airshid, C.H.Giles, S.K.Jain und A.S.A.Hassan, J.chem. Soc. 72 (1956)

C.H.Giles, T.J.Rose und D.G.M.Vallance, J.chem.Soc. 3799 (1952)

T.Barr und J.B.Speakman, J.Textile Inst. 35 77 (1944)

H.Zahn, Z.Naturforschg. 2b 286 (1947)

E.Elöd und H.Zahn, Melliand Textilber. 29 17 (1948) und 30 17 (1949)

62. G.Otto, Leder 6 207 (1955)

63. M.Fenghelmann, Angew. 68 219 (1956)

64. L.G.Groves und S.Sugden, J.chem.Soc. (London) 171 (1937)
s. a. McAlpine und C.P.Smyth, J.chem.Physics 3 55 (1935)

65. H.A.Stuart, Die Struktur des freien Moleküls, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1952, 6 - 11

66. H.Hörmann und H.Endres, Z.Naturforschg. 10b 150 (1955)

67. B.Franck, H.Hörmann und S.Scheibe, Chem.Ber. 90 330 (1957)

68. F.Bohlmann, Chem.Ber. 84 490 (1951)

69. R.Brill, Z.physik.Chem. (B) 53 61 (1943)

70. L.G.Wallner, Mh. Chem. 79 86, 279 (1948)

71. E.Kordes, F.Günther, L.Büchs und W.Göttner, Kolloid-Z. 119 23 (1950)

72. D.R.Holmes, C.W.Bunn und D.J.Smith, J.Polymer.Sci. 17 159 (1955)

73. R.Huisgen und H.Walz, Ber. 89 2616 (1956)

74. J.Kinoshita, Makromol.Chem. 33 1,21 (1959)

75. L.Pauling und R.B.Corey, Proc.Nat.Acad.Sci.,USA, 39 253 (1953)

76. H.Hopff, A.Müller und F.Wenger, Die Polyamide, Springer-Verlag, 1954

77. O.Brigleb, Z.phys.Chem., B31 58 (1933) und 32 305 (1936)

78. M.J.S.Dewar, J.Chem.Soc. (London) 406 (1946)

79. F.Oehme, Z.Naturforschg.12b 370 (1957)

80. F.A.Isherwood und D.H.Cruickshank , Nature 174 123 (1954)

Lebenslauf

Am 17. März 1932 wurde ich, Hans von Portatius, als Sohn des Dipl.-Ing. Botho von Portatius und seiner Ehefrau Klari, geb. Barna, in Köthen/Anhalt geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Magdeburg, danach das dortige staatliche Dom- und Klostergymnasium. Die sehr bald einsetzenden Bombenangriffe bedingten in der Kriegszeit einen öfteren Schulwechsel, so mehrjährige Aufenthalte in Schlesien (Hirschberg i. Riesengebirge, Liegnitz) und im Harz (Quedlinburg). Infolge der Übersiedlung meiner Eltern nach Leuna bei Merseburg im Jahre 1948 wurde ich Schüler des ehemaligen staatlichen Domgymnasiums in Merseburg, wo ich im Jahre 1950 meine Reifeprüfung ablegte.

Nach einjähriger Praktikantenzeit auf dem Versuchsgut Stichelsdorf der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg immatrikulierte ich im Wintersemester 1951 als Student der Chemie an dieser Universität.

Von November 1955 bis Februar 1957 fertigte ich unter der Leitung von Professor Dr. F. Asinger meine Diplomarbeit an: "Über die Einwirkung von 2-Mercaptopentenon-(3) auf Diazoniumsalze" und legte darauf im Juni 1957 meine Diplomprüfung ab. Meine Lehrer in Halle waren die Herren Professoren Funk, Langenbeck, Sauerwald und Runge.

Seit dem 1. Juli 1957 bin ich hier in München als Doktorand unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Graßmann im Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung tätig.